HORMONALE WECHSELWIRKUNGEN BEI DER KONTROLLE HEPATISCHER ENZYMSPIEGEL

Primärkulturen von Hepatozyten als Modellsysteme
für Untersuchungen zur Stoffwechselregulation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Rolf Gebhardt

aus Crailsheim

1980

HORMONALE WECHSELWIRKUNGEN BEI DER KONTROLLE HEPATISCHER ENZYMSPIEGEL

Primärkulturen von Hepatozyten als Modellsysteme
für Untersuchungen zur Stoffwechselregulation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Rolf Gebhardt

aus Crailsheim

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 25.2.1980

Dekan: Prof. Dr. M. Hanack

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Mecke

2. Berichterstatter: Doz. Dr. A. Wendel

Meinen Eltern

Abstract

GEBHARDT, ROLF:

HORMONALE WECHSELWIRKUNGEN BEI DER KONTROLLE HEPATISCHER ENZYMSPIEGEL - Primärkulturen von Hepatozyten als Modellsysteme für Untersuchungen zur Stoffwechselregulation

Für die Kultivierung von Hepatozyten wurde ein Perifusionssystem entwickelt, das anstelle periodischer Wechsel des Kulturmediums (diskontinuierliches System) ein kontinuierliches Überströmen der Zellmonolayer ermöglicht. Dieses System zeichnet sich durch ein konstantes und kontrollierbares extrazelluläres Milieu aus. Für die Perifusion wurden optimale Bedingungen ausgearbeitet und die Zusammensetzung eines Kulturmediums angegeben, das die Erhaltung von Stoffwechselleistungen im Bereich des Stickstoffmetabolismus begünstigt. An Hand morphologischer und biochemischer Kriterien wurden die perifundierten und diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten vergleichend charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, daß die Perifusion die Monolayerbildung beschleunigt und die Langzeit-Kultivierung fördert. Perifundierte Hepatozyten zeigten ferner erhöhte Stoffwechselleistungen und ausgeprägtere regulatorische Phänomene. Die verschiedenartig kultivierten Zellen wiesen eine sehr ähnliche Präferenz zur Metabolisierung von Aminosäuren auf; jedoch konnte eine positive Stickstoffbilanz nur bei Perifusion errechnet werden.

Untersuchungen zur hormonalen Regulation der Glutamin-Synthetase (GS) und der Enzyme des Harnstoffzyklus führten zur Charakterisierung der dabei wirksamen Hormone und deren Wechselwirkungen. Eine Steigerung der GS-Aktivität konnte nur durch eine komplexe Interaktion von Dexamethason und Somatotropin hervorgerufen werden, in die auch Trijodthyronin und Insulin eingreifen können. Die Natur dieser Interaktion wurde analysiert und mutmaßliche Eigenschaften der einzelnen Hormonwirkungen abgeleitet. Bei den Harnstoffzyklusenzymen konnte die induktive Wirkung von Glucagon eindeutig nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde ein permissiver Effekt von Glucocorticoiden entdeckt.

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Mecke in der Zeit von April 1976 bis Dezember 1979 am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Gebhardt, R. & Mecke, D., Perifused Monolayer Cultures of Rat Hepatocytes as an Improved In Vitro System for Studies on Ureogenesis (1979) Exp. Cell Res. 124, 349 - 359.

Gebhardt, R. & Mecke, D., Permissive Effect of Dexamethasone on Glucagon Induction of Urea-Cycle Enzymes in Perifused Primary Monolayer Clutures of Rat Hepatocytes (1979) Eur. J. Biochem. 97, 29 - 35.

Gebhardt, R. & Mecke, D., The Role of Growth Hormone, Dexamethasone, and Triiodothyronine in the Regulation of Glutamine Synthetase in Primary Cultures of Rat Hepatocytes (1979) Eur. J. Biochem. 100, 519 - 525.

Herrn Prof. Dr. D. Mecke danke ich für das stete Interesse an meiner Arbeit, sowie die großzügige Unterstützung und Förderung.

Herzlicher Dank geht auch an alle meine Kollegen, die durch ihre selbstverständliche Mitarbeit bei der Präparation und Kultivierung von Hepatozyten meine Arbeit außerordentlich unterstützt haben. Stellvertretend möchte ich hier Frl. M. Behringer, Herrn W. Jung, Herrn Dipl. Biochem. H. Metzler, Herrn Dipl. Biochem. G. Schirmer und Herrn W. Schulz nennen. Die vielen gemeinsamen Gespräche haben nicht nur manches Problem lösen helfen, sondern auch die Freude an der alle verbindenden Arbeit erhöht.
Besonders dankbar bin ich Herrn R. Tacke, ohne dessen außergewöhnlichen Einsatz mancher Versuch vom Umfang her nicht zu bewältigen gewesen wäre.

Herrn W. Stock danke ich für die Durchführung der Aminosäure-Analysen und Herrn E. Eichele, dem Leiter der Institutswerkstätte, und seinen Mitarbeitern für die gewissenhafte Anfertigung der Kulturkammern.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes danke ich für das großzügig gewährte Doktorandenstipendium. In dankenswerter Weise wurde mir außerdem die Teilnahme an verschiedenen Tagungen im Ausland ermöglicht, sowie ein mehrwöchiger Aufenthalt am COLD SPRING HARBOR LABORATORY, der freundlicherweise auch von der Deutschen Forschungsgemeinschaft mitgetragen wurde.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Homöostase und endokrine Regulation des Leberstoffwechsel	1
1.2.	Glutaminstoffwechsel	4
1.3.	Die Regulation der Glutamin-Synthetase	7
1.4.	Die Regulation der Harnstoffsynthese	10
1.5.	Adaptive Änderungen der Enzyme des Harnstoffzyklus	15
1.6.	Modellsysteme für Untersuchungen des Leberstoffwechsels	19
1.7.	Primärkulturen von Leberparenchymzellen	22
1.8.	Ziele der vorliegenden Arbeit	26
2.	MATERIALIEN UND METHODEN	28
2.1.	Versuchstiere	28
2.2.	Geräte	28
2.3.	Verbrauchsmittel	29
2.3.1.	Materialien	29
2.3.2.	Chemikalien, Enzyme, Hormone	29
2.4.	Lösungen und Kulturmedien	32
2.4.1.	Lösungen für die Zellisolation	32
2.4.2.	W/AB 77 - Medium	32
2.4.3.	L-15 Medium (modifiziert)	36
2.4.4.	Halbsynthetisches Kulturmedium	36
2.4.5.	Stammlösungen von Hormonen und Agentien	37
2.5.	Isolierung von Leberparenchymzellen	38
2.5.1.	Isolierung von Hepatozyten mittels Perfusion	38

		Seite
2.5.2.	Isolierung von Hepatozyten aus Leberschnitten	39
2.6.	Kultivierung der Hepatozyten	40
2.6.1.	Allgemeine Vorbereitungen	40
2.6.1.1.	Isolierung von Kollagen	40
2.6.1.2.	Beschichten der Kulturgefäße mit Kollagen	40
2.6.1.3.	Beschichten der Kulturgefäße mit denaturiertem Rinder-Serum-Albumin	41
2.6.2.	Diskontinuierliche Kultur	41
2.6.2.1.	Kultivierung in Petrischalen	41
2.6.2.2.	Inkubation der Zellkulturen in Gegenwart von Hormonen	42
2.6.3.	Perifusion	43
2.6.3.1.	Aufbau des Perifusionssystems	43
2.6.3.2.	Arbeitsweise der Perifusion	48
2.6.3.3.	Sterilisation der Perifusionsapparatur	49
2.6.3.4.	Kultivierung im perifundierten System	50
2.6.3.5.	Spezielle Inkubationsprotokolle für die Perifusion	51
2.7.	Histochemische und zytologische Verfahren	52
2.7.1.	Fixierung der Zellkulturen	52
2.7.2.	Anfärbung der Zellkulturen mit Haematoxilin	52
2.7.3.	Lipidfärbung mit Sudan Schwarz B	53
2.7.4.	Zählung der Zellkerne	53
2.8.	Biochemische Messungen	53
2.8.1.	Aufbereitung der Zellkulturen	53
2.8.2.	Proteinbestimmung	54
2.8.3.	DNS-Bestimmung	54

		Seite
2.8.4.	Metabolitbestimmungen	57
2.8.4.1.	Aufbereitung des Kulturmediums zur Bestimmung von Metaboliten	57
2.8.4.2.	Aminosäureanalyse	57
2.8.4.3.	Enzymatische Bestimmung von Alanin	58
2.8.4.4.	Enzymatische Bestimmung von Glutamin	59
2.8.4.5.	Isolation der Glutamin-Synthetase aus E.coli	59
2.8.4.6.	Die Bestimmung von Harnstoff im Kulturmedium	60
2.8.5.	Aktivitätsbestimmung von Enzymen	60
2.8.5.1.	Bestimmung der Tyrosin Aminotransferase	60
2.8.5.2.	Bestimmung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase	60
2.8.5.3.	Bestimmung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase	61
2.8.5.4.	Bestimmung der Glutamin-Synthetase	61
2.8.5.5.	Bestimmung der Harnstoffzyklusenzyme	62
2.8.5.5.1.	Carbamoylphosphat Syntase	62
2.8.5.5.2.	Ornithin Transcarbamoylase	63
2.8.5.5.3.	Argininosuccinat Synthetase	64
2.8.5.5.4.	Argininosuccinat Lyase	64
2.8.5.5.5.	Arginase	65
2.8.5.6.	Bestimmung von Harnstoff und Citullin	65
2.9.	Darstellung der Ergebnisse	68
3.	ERGEBNISSE	69
3.1.	Vergleichende Charakterisierung von Hepatozyten in Perifusion und gewöhnlicher Kultur	69
3.1.1.	Morphologische Beobachtungen	69
3.1.1.1.	Die Entwicklung der Hepatozytenkultur	69

		Seite
3.1.1.2.	Einfluß spezieller Kulturbedingungen	76
3.1.2.	Zellbiologische und biochemische Parameter	84
3.1.2.1.	Einfluß des Substratums auf die Anheftung der Hepatozyten	84
3.1.2.2.	Zeitliche Änderung des Proteingehalts	86
3.1.2.3.	Zeitliche Änderung des DNS-Gehalts	88
3.1.3.	Stoffwechseleigenschaften	91
3.1.3.1.	Aminosäurestoffwechsel	92
3.1.3.2.	Harnstoffsynthese unter normalem und erhöhten Stickstoffangebot	101
3.1.3.3.	Einfluß der extrazellulären Albuminkonzentration auf die Harnstoffsynthese	104
3.1.3.4.	Stimulation der Harnstoffsynthese durch Glucagon	105
3.1.3.5.	Stickstoffbilanz	107
3.1.4.	Aktivitäten verschiedener Enzyme des Stickstoffstoffwechsels	109
3.1.4.1.	Enzyme des Harnstoffzyklus	111
3.1.4.2.	Transaminasen	114
3.1.4.3.	Glutamin-Synthetase	114
3.2.	Hormonale Regulation der Glutamin-Synthetase	117
3.2.1.	Einfluß verschiedener Hormone auf die Aktivität der Glutamin-Synthetase	117
3.2.2.	Zeitabhängigkeit der Wirkung von Wachstumshormon und Dexamethason	122
3.2.3.	Einfluß der Glutamin-Konzentration auf die hormonale Stimulation der Glutamin-Synthetase	127
3.2.4.	Einfluß der Zelldichte auf die Stimulation der Glutamin-Synthetase	128

		Seite
3.2.5.	Einfluß von frischem und "verbrauchtem" Kulturmedium	129
3.2.6.	Einfluß der Konzentration des Wachstumshormons auf die Stimulation der Glutamin-Synthetase	130
3.2.7.	Einfluß der Konzentration von Dexamethason auf die Stimulation der Glutamin-Synthetase	132
3.2.8.	Einfluß der Präinkubation mit Dexamethason	134
3.2.9.	Einfluß der Präinkubation mit Wachstumhormon	137
3.2.10	Einfluß von Inhibitoren der Proteinbiosynthese während der Präinkubation	139
3.2.11.	Wechselwirkung von Insulin mit der Stimulation der Glutamin-Synthetase durch das Hormongemisch aus Dexamethason und Wachstumshormon	141
3.2.12.	Stimulation der Glutamin-Synthetase in der Perifusion	144
3.3.	Hormonale Regulation der Enzyme des Harnstoffzyklus	146
3.3.1.	Der Einfluß von Glucagon auf die Arginase in perifundierten und diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten	147
3.3.2.	Zeitabhängigkeit der Wirkung von Glucagon und Dexamethason	149
3.3.3.	Einfluß der Präinkubation mit Dexamethason auf die Glucagonwirkung	160
3.3.4.	Abhängigkeit der Stimulation von der Glucagonkonzentration	162
3.3.5.	Einfluß von Cycloheximid	163
3.3.6.	Einfluß von Dibutyryl-cAMP	163

		Seite
3.3.7.	Einfluß von Adrenalin auf die Harnstoff-zyklusenzyme	165
3.3.8.	Abhängigkeit der Hormonwirkung vom Kulturmedium und der Leucinkonzentration	166
4.	DISKUSSION	169
4.1.	Die Kultivierung von Hepatozyten	169
4.1.1.	Morphologische Entwicklung der Hepatozytenkultur	169
4.1.2.	Biochemische Entwicklung	176
4.1.3.	Allgemeine Stoffwechselcharakteristik der kultivierten Hepatozyten	188
4.1.4.	Einflüsse der Kulturbedingungen	192
4.1.4.1.	Substratum	192
4.1.4.2.	Kulturmedium	195
4.1.4.3.	Serum	198
4.1.4.4.	Hormone	199
4.2.	Hormonale Regulation	202
4.2.1.	Die Regulation der Glutamin-Synthetase	202
4.2.1.1.	Dexamethason	202
4.2.1.2.	Wachstumshormon	204
4.2.1.3.	Trijodothyronin und Insulin	208
4.2.1.4.	Die Regulation *in vitro*	211
4.2.1.5.	Überlegungen zum Mechanismus	213
4.2.1.6.	Regulatorische Phänomene in Hepatomazellen - die Rolle von Glutamin	215
4.2.1.7.	Regulation *in vivo* und physiologische Bedeutung	217

		Seite
4.2.2.	Die Regulation der Enzyme des Harnstoffzyklus	219
4.2.2.1.	Glucagon und cAMP	219
4.2.2.2.	Dexamethason	222
4.2.2.3.	Die molekulare Ursache des Aktivitätsanstiegs	223
4.2.2.4.	Die Ausprägung der Glucagonwirkung in den verschiedenen Kultursystemen	225
4.2.2.5.	Die Regulation in vivo und die physiologische Bedeutung	228
5.	ABSCHLIESSENDE BETRACHTUNGEN	233
5.1.	Vergleich von Perifusion und diskontinuierlicher Kultur	233
5.2.	Primäre Leberzellkulturen als Modellsysteme für die hormonale Regulation des Leberstoffwechsels	237
5.3.	Die Leberparenchymzelle in Primärkultur - eine differenzierte Zelle?	241
6.	ZUSAMMENFASSUNG	245
7.	LITERATURVERZEICHNIS	248

Abkürzungen

Bt_2-cAMP	:	Dibutyryl-cycloAMP
DDC	:	Diäthyldithiocarbamat
Glu-N	:	Glutamin
Hepes	:	4-(2-Hydroxyäthyl)-1-Piperazin Äthansulfonsäure
SEM	:	Scanning Elektronenmikroskop
TPB	:	Tryptose Phosphat Bouillon
VLDL	:	Prä-ß-Lipoproteine ('Very Low density lipoproteins')

Enzyme

ARG	:	Arginase oder L-Arginin Amidohydrolase (EC 3.5.3.1)
ASL	:	Argininosuccinat Lyase oder L-Argininosuccinat Arginin Lyase (EC 4.3.2.1)
ASS	:	Argininosuccinat Synthetase oder L-Citrullin: L-Aspartat Ligase (AMP-bildend) (EC 6.3.4.5).
CPS	:	Carbamoylphosphat Synthase oder ATP: Carbamat Phosphotransferase (dephosphorylierend) (EC 2.7.2.5)
G6PDH	:	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase oder D-Glucose-6-Phosphat: $NADP^+$ 1-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.49)
GOT	:	Aspartat Aminotransferase oder L-Aspartat: 2-Ketoglutarat Aminotransferase (EC 2.6.1.1)
GPT	:	Alanin Aminotransferase oder L-Alanin: 2-Ketoglutarat Aminotransferase (EC 2.6.1.2)
GS	:	Glutamin Synthetase oder L-Glutamat: Ammonium Ligase (ADP-bildend) (EC 6.3.1.2)
OTC	:	Ornithin Carbamoyltransferase oder Carbamoylphosphat: L-Ornithin Carbamoyltransferase (EC 2.1.3.3)
6PGDH	:	Phosphogluconat Dehydrogenase oder 6-Phospho-D-Gluconat: $NADP^+$ 2-Oxidoreduktase (decarboxylierend) (EC 1.1.1.44)
TAT	:	Tyrosin Aminotransferase oder L-Tyrosin: 2-Ketoglutarat Aminotransferase (EC 2.6.1.5)

1. EINLEITUNG

1.1. Homöostase und endokrine Regulation des Leberstoffwechsels

Das zentrale Problem der Regulation des Metabolismus im intakten tierischen Organismus ist die Homöostase, d.h. die Erhaltung einer metabolischen Ausgewogenheit trotz vielfältiger Einwirkungen und Störungen durch die Umgebung. Die Leber als Hauptstoffwechselorgan ist an den homöostatischen Prozessen entscheidend beteiligt und ist infolgedessen ein wichtiges Zielorgan der Kommunikations- und Regulationssysteme des Organismus.

Für die Kommunikation der einzelnen Gewebe stehen im höheren Organismus verschiedene Möglichkeiten der Signalübermittlung zur Verfügung. Die endokrine Signalübertragung mittels Hormonen, die über die Blutbahn verbreitet werden, ist eine davon, die nervöse Reizleitung eine andere. Die endokrine Steuerung des Metabolismus steht im Falle der Leber an allererster Stelle (vgl. 287, 295). Zusätzlich scheint ein Großteil der zahlreichen nieder- und hochmolekularen Bestandteile des Blutes, um deren Regulation es überwiegend geht, in direkter Weise auf die Leber einzuwirken und in Wechselwirkung mit den Hormonen das Stoffwechselgeschehen zu beeinflussen.

Die Leber ist jedoch nicht nur ein Zielorgan der endokrinen Steuerung, das seine metabolische Aktivität den wechselnden Anforderungen des Gesamtorganismus anpaßt und einen Beitrag zur Versorgung und Entsorgung der übrigen Organe leistet, sie

greift vielmehr selbst auf mehrfache Weise in den Signalfluß ein. Besonders hervorzuheben ist diesbezüglich die Kontrolle der im Blut kreisenden Hormonkonzentrationen, die durch verschiedene Arten der Inaktivierung und des Abbaus ausgeübt wird (185, 347). Ferner kann die Leber, auf Grund der Synthese und Ausschüttung von Somatomedinen (221, 284), als eigenständiges endokrines Organ angesehen werden.

Im Gegensatz hierzu spielt die nervöse Steuerung vermutlich eine untergeordnete Rolle, da insbesondere das parenchymale Gewebe nur wenig innerviert scheint (101, 353). Efferente Nerven scheinen vor allem an der Regulation des Blutflusses durch die Leber beteiligt zu sein (120). Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß nervöse Reize im parenchymalen Gewebe auch die Kontrolle der Glykogenolyse beeinflussen (264, 321), sowie eine Modulation anderer hormoneller Wirkungen von Insulin und Glucagon ermöglichen (101).

Im allgemeinen müssen homöostatische Mechanismen schnell ablaufen und relativ kurzlebig sein, um rasche Fluktuationen der regulierten metabolischen Prozesse zu ermöglichen. Je nach der zur Verfügung stehenden Zeitspanne liegen der homöostatischen Regulation verschiedenartige Mechanismen zugrunde. Die schnell, d.h. im Minutenbereich, reagierenden Mechanismen bedienen sich der in der Zelle bereits vorliegenden Enzyme und anderer funktionaler Proteine und ändern deren Aktivität. Beispiele hierfür sind etwa die allosterische Regulation durch sogenannte 'second messenger' oder andere Effektoren, die chemische Modifikation von Enzymen, wobei Phosphorylierungs- / Dephosphory-

lierungsreaktionen im Vordergrund stehen, und die Beeinflussung der Zellpermeabilität. Im Gegensatz hierzu verlaufen Prozesse wie die Neusynthese von Enzymproteinen, bei denen der regulatorische Eingriff schon auf der Ebene der Transkription erfolgt, relativ langsam, d.h. im Bereich von Stunden bis Tagen. Von der zeitlichen Dauer her gesehen zwischen diesen Extremen - jedoch mit fließendem Übergang - liegen Abläufe, die posttranskriptional eingreifen, wie beispielsweise die Bildung von Polysomen oder die proteolytische Inaktivierung von Enzymproteinen.

An der Kontrolle der verschiedenartigen Stoffwechselfunktionen sind meist mehrere dieser regulatorischen Mechanismen beteiligt, so daß eine abgestufte und zeitlich gestaffelte Reaktion möglich wird. Eine in dieser Hinsicht relativ gut untersuchte Stoffwechselleistung der Leber ist die Regulation des Blutglucosespiegels (362). Einige der hieran beteiligten Kontrollmechanismen, die rasch ansprechen und insbesondere die Synthese und den Abbau von Glycogen steuern, haben in den letzten Jahren eine umfangreiche molekulare Deutung erfahren (141, 143). Dagegen ist die Kenntnis längerfristiger Adaptationsvorgänge noch recht lückenhaft. Für einzelne Beispiele gluconeogenetischer Enzyme, etwa der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (313), oder am Aminosäureabbau beteiligter Enzyme wie der Tryptophan Pyrrolase (15, 96) und besonders der Tyrosin Aminotransferase (22, 384),konnte jedoch bereits eine detailliertere Kenntnis der molekularen Abläufe erarbeitet werden.

In weiten Bereichen des Leberstoffwechsels herrscht jedoch noch eine eher phänomenologische Beschreibung der regulatori-

schen Zusammenhänge vor. Mangels geeigneter Modellsysteme, die die Komplexität des Gesamtorganismus schrittweise reduzieren, ist es in vielen Fällen bislang noch nicht gelungen, einen Überblick über die hormonellen und metabolischen Faktoren zu erhalten, die an der Kontrolle dieser Stoffwechselfunktionen beteiligt sind. Dies gilt auch für so wichtige Stoffwechselbereiche wie den Aminosäure- und Stickstoffstoffwechsel. Für zwei Teilgebiete davon, den Glutaminmetabolismus und den Harnstoffzyklus, soll im folgenden ein kurzer Überblick über den derzeitigen Kenntnisstand regulatorischer Phänomene gegeben werden. Im Brennpunkt dieser Betrachtung soll vor allem die Kontrolle der Enzymspiegel von Glutamin-Synthetase und von Enzymen des Harnstoffzyklus stehen, da dieser Frage ein Teil der vorliegenden Untersuchungen gewidmet ist.

1.2. Glutaminstoffwechsel

Glutamin spielt eine wichtige Rolle im Stickstoffstoffwechsel, da der Amid-Stickstoff dieser Aminosäure für eine Vielzahl von Synthesen benötigt wird, die zur Bildung von Nukleotiden, Aminosäuren und Aminozuckern führen (236, 359). Bei Säugetieren finden diese Synthesen überwiegend in der Leber statt. Hier nimmt das Glutamin (bei Primaten) auch an manchen Entgiftungsreaktionen teil (256). Außerdem scheint es an der Regulation der Glykogensynthese (163) und der Autophagie (334) beteiligt zu sein. In extrahepatischen Geweben wird Glutamin für weitere bedeutsame Reaktionen herangezogen. In der Niere spielt es eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Säure/Basen-Gleich-

gewichts. Im Gehirn ist Glutamin vermutlich Ausgangsstoff für die Bildung der Neurotransmitter Glutamat und α-Aminobuttersäure (365). Die Bedeutung von Glutamin wird auch dadurch unterstrichen, daß diese Aminosäure in hoher Konzentration im Blut und in der Leber (174, 212) vorliegt und einen raschen Turnover zeigt (89).

Bis vor wenigen Jahren wurde die Leber allgemein als der dominierende Ort der Glutaminsynthese angesehen. Diese Vermutung basierte auf der relativ hohen Aktivität der Glutamin-Synthetase in der Leber (174) im Vergleich zu anderen Organen und hielt sich, obwohl bereits 1951 von Flock et al. (98) gezeigt wurde, daß der Glutamingehalt des Blutes nach Hepatektomie ansteigt. Erst der Nachweis von Glutamin-Synthetaseaktivität im Muskel (152), die zwar gering ist, auf Grund der großen Gewebsmasse jedoch zu einer bedeutsamen Synthesekapazität führt, leitete ein Umdenken ein. In der Folge konnte schließlich verschiedentlich direkt nachgewiesen werden, daß der Skelettmuskel große Mengen von Glutamin zu bilden vermag (4, 220).

Aus heutiger Sicht scheint somit Glutamin eine wichtige Rolle beim Transport von Stickstoff aus peripheren Organen zur Leber zu spielen. Glutamin wird dabei hauptsächlich im Muskel gebildet, durch die Blutbahn zum Darm transportiert und dort vermittels Glutaminase II (EC 2.6.1.15) gespalten (213, 399). Der entstehende Ammoniak gelangt dann über die Pfortader zur Leber und wird dort vor allem in Harnstoff überführt, kann jedoch offensichtlich auch kurzfristig als Alanin und Aspartat gespeichert werden (46, 47).

Eine offene Frage in diesem Zusammenhang war lange Zeit, ob Glutamin auch direkt von der Leber aufgenommen und hier metabolisiert wird. Untersuchungen an der isoliert perfundierten Leber (212), sowie an isolierten Hepatozyten (213) deuteten zunächst darauf hin, daß eine Aufnahme von Glutamin erst oberhalb einer Konzentration von 1 - 2 mM erfolgt, also nicht bei physiologischen Konzentrationen. Nach neueren Untersuchungen wird Glutamin aber auch in diesem Konzentrationsbereich von der Leber metabolisiert, wenn gleichzeitig Ammoniumionen anwesend sind (60, 132). Diese Befunde passen gut zu der Beobachtung von Charles (65), wonach Ammoniumionen die Glutaminase I aus Lebermitochondrien zu aktivieren vermag. An isolierten Hepatozyten konnte ferner gezeigt werden, daß Glucagon, das auch selbst den Glutaminabbau fördert, die Wirkung von NH_4Cl weiter steigern kann (158).

Mithin scheint in der Leber der Abbau von Glutamin stark gegenüber der Synthese bevorzugt zu sein. Vor diesem Hintergrund wurde von Lund vermutet, die Glutamin-Synthetase könnte in der Leber weitgehend gehemmt vorliegen (212). Obwohl es bisher keine Hinweise auf die Natur eines derart potenten Inhibitors gibt, könnte der Fall dieses Enzyms ähnlich liegen wie bei der Asparagin-Synthetase, die in der adulten Leber eng assoziiert mit einem Proteininhibitor vorliegt (146, 275).

Genauere Untersuchungen des Glutaminstoffwechsels sprechen jedoch gegen eine vollständige Hemmung. Vielmehr konnte von Häußinger und Sies (133) mittels radioaktiv markierter Verbindungen gezeigt werden, daß Glutaminabbau und -synthese nebenein-

ander ablaufen. Unter gewissen Bedingungen (d.h. bei acidotischen pH-Werten) fanden Lueck und Miller (211) eine Verschiebung dieser Balance zugunsten der Glutaminsynthese. Ferner lassen die Befunde in vivo von Duda und Handler (89) vermuten, daß es noch andere, bislang unbekannte Bedingungen gibt, die die Glutaminsynthese in der Leber fördern und diese sogar als Konkurrenzreaktion zur Harnstoffbildung nach einer Belastung des Organismus mit Ammoniumionen in Erscheinung treten lassen.

1.3. Die Regulation der Glutamin-Synthetase

Derzeit sind komplexe Mechanismen, die die Glutamin-Synthetase regulieren, nur für Prokaryonten, z.B. E. coli (145, 341, 360), näher charakterisiert, während die Kontrolle des Enzymspiegels und der -aktivität in Eukaryonten nur unzureichend aufgeklärt ist. Bislang kann mit einiger Sicherheit nur gesagt werden, daß ähnliche Mechanismen wie bei Prokaryonten, d.h. die chemische Modifikation des Enzyms mittels Adenylierung - Deadenylierung (145, 360), bei der Glutamin-Synthetase aus Rattenleber nicht wirksam sind (83, 232). Offensichtlich scheint bei dem Enzym aus Eukaryonten auch kein einheitlicher Mechanismus vorzuliegen, vielmehr ist bei höheren Organismen die Regulation vermutlich von Organ zu Organ verschieden und den spezifischen Funktionen und Bedürfnissen der einzelnen Gewebe angepaßt.

Über die Kontrolle der Glutamin-Synthetase aus HTC-Zellen liegen zur Zeit die meisten Informationen vor. Hier wird das Enzym durch Glucocorticoide induziert (11, 76, 181), und die spezifische Aktivität steht in einer inversen Relation zur ex-

trazellulären Konzentration an Glutamin (11, 181). Eine Beeinflussung der Glutamin-Synthetase durch Glutamin wurde auch von verschiedenen anderen tierischen Zellinien beschrieben (17, 81, 167, 277, 372, 383). Offensichtlich handelt es sich bei dem Effekt des Glutamins nicht um eine Produkthemmung, obwohl eine solche bei höheren Glutaminkonzentrationen an gereinigtem Enzym beobachtet werden kann (82). Vielmehr konnte mit immunchemischen Methoden an HTC-Zellen nachgewiesen werden, daß das Glutamin den Abbau des Enzyms stark beschleunigt, die Synthese jedoch nicht beeinflußt (10, 75). Ähnliche Befunde wurden von Milman et al. (255) an Chinesischen Hamsterleberzellen erhoben. Vermutlich wird die Degradation der Glutamin-Synthetase durch ein labiles Polypeptid (75) eingeleitet, das in An- und Abwesenheit von Glutamin synthetisiert, aber durch Glutamin stabilisiert wird (104).

Die Befunde an Hepatoma-Zellen bezüglich einer Glutaminwirkung lassen sich offensichtlich nicht auf die Leber in vivo übertragen. Hierauf deuten verschiedene Studien am Ganztier hin, bei denen kein Einfluß der Glutaminkonzentration im Blut nachgewiesen werden konnte (174, 402, 403).

Schwankungen der Glutamin-Synthetaseaktivität wurden bei Ganztierversuchen bisher nur über längere Zeiträume hinweg beobachtet. In der Rattenleber sinkt die Enzymaktivität ab, wenn die Ernährung auf eine proteinreiche Diät umgestellt wird (208, 294), ebenso ist sie im Hunger vorübergehend gesenkt (194, 403).

Die Untersuchungen zur Regulation der Glutamin-Synthetase durch

hormonelle Faktoren liefern ein sehr widersprüchliches Bild. Raina und Rosen (294) fanden nach Adrenalektomie einen Rückgang der Enzymaktivität, der durch Gabe von Cortisol unterbunden werden konnte. Nach Wu (402) war Cortisol auch an der jungen Ratte wirksam. Diese Ergebnisse passen zu der oben erwähnten Dexamethason-Induktion des Enzyms bei HTC-Zellen und anderen Zellinien. Ferner wurde die induzierende Wirkung von Glucocorticoiden in anderen Geweben der Ratte, etwa der neuralen Retina, beschrieben (258, 259).

Im Gegensatz hierzu konnte von Knox et al. (174) kein signifikanter Effekt von Cortisol in normalen und adrenalektomierten Ratten nachgewiesen werden. Allerdings waren auch hier die Enzymspiegel in adrenalektomierten Ratten deutlich erniedrigt. Von Wong und Dunn (400) wurde nach Hypophysektomie zwar ein Abfall der Enzymaktivität beobachtet, dieser konnte aber durch Cortisol nicht aufgehoben werden. In dieser Studie wurde hingegen eine Beteiligung von Wachstumshormon an der Regulation der Glutamin-Synthetase wahrscheinlich gemacht. Nach Gabe von Wachstumshormon konnte jedoch nur ein Teil des Aktivitätsverlustes, der nach Hypophysektomie auftrat, rückgängig gemacht werden. Dies berechtigt zu der Vermutung, daß den zahlreichen Sekundäränderungen im endokrinen System nach Hypophysektomie eine nicht geringe Bedeutung zukommen könnte. So tritt hier unter anderem eine Unterfunktion der Nebenniere und der Schilddrüse auf, da sowohl ACTH als auch Thyrotropin fehlen. Eine Beteiligung von Cortisol oder Thyroxin ist somit denkbar. In der Tat wurde von Wu (402) schon vor mehreren Jahren eine gering-

fügige Wirkung von Thyroxin bei jungen Ratten beschrieben.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß trotz zahlreicher Bemühungen, die hormonale Regulation der Glutamin-Synthetase in der Leber abzuklären, keine einheitlichen und überzeugenden Resultate erhalten wurden. Dies korrespondiert mit der Tatsache, daß auch die Rolle dieses Enzyms im Glutaminstoffwechsel der Leber weitgehend unklar blieb, und bislang keine zufriedenstellende Erklärung für die hohe Aktivität dieses Enzyms in der Leber gegeben werden konnte. Gerade in Bezug auf diese Fragen könnten jedoch von einer genaueren Kenntnis der hormonellen und metabolischen Regulation wesentliche Impulse ausgehen.

1.4. Die Regulation der Harnstoffsynthese

Die wichtige Rolle des Harnstoffzyklus als Detoxifikationsmechanismus für Ammoniak ist heute allgemein anerkannt. In dieser Eigenschaft dient der Stoffwechselweg nicht nur der Beseitigung von gelegentlich auftretenden größeren Mengen an exogenem Ammoniak, wie sie beispielsweise durch die Tätigkeit der Darmbakterien anfallen, sondern er hat unter den Bedingungen eines ausgewogenen metabolischen Gleichgewichts auch für die Ausscheidung einer Reststickstoffmenge zu sorgen, so daß insgesamt eine ausgeglichene Stickstoffbilanz erzielt wird. Letztere Bedingung erfordert eine feinsinnige Regulation der Syntheserate, die sich sowohl auf kurzfristige (periodische Nahrungsaufnahme), als auch langfristige (Änderung der Ernährungsbedingungen) Schwankungen der Stickstoffzufuhr einzustellen vermag.

Über die Mechanismen, die dieser Regulation zugrunde liegen, herrscht noch keine vollkommene Klarheit; es hat jedoch den Anschein, als seien an der Kurzzeit-Adaptation vorwiegend allosterische Mechanismen beteiligt, während bei der Langzeit-Adaptation hauptsächlich die Enzymspiegel verändert werden.

Ein sehr wichtiger Regelkreis für die Kurzzeit-Regulation ist vermutlich das N-Acetylglutamat - Arginin - System, das an der Carbamoylphosphat Synthase angreift (177, 343, 344, 345). Dieser Regelmechanismus schließt die allosterische Aktivierung der Carbamoylphosphat Synthase durch N-Acetylglutamat, als auch die der N-Acetylglutamat Synthase durch Arginin ein. Die Komplexität dieses Systems wird erhöht durch zahlreiche Wechselwirkungen mit Mg^{2+} (233), Ca^{2+} (234) und die Inaktivierung der Carbamoylphosphat Synthase bei suboptimalen Ornithinkonzentrationen (177, 366). Ferner sind Beeinflussungen durch den Austransport von N-Acetylglutamat aus den Mitochondrien und über die Verteilung des Arginins zwischen Cytosol und Mitochondrien wahrscheinlich (234).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation des Flusses durch den Harnstoffzyklus wird dadurch gegeben, daß konkurrierende Reaktionen zur Fixierung des Ammoniaks zur Verfügung stehen. So wird unter gewissen Bedingungen (Einfluß von Leucin) die Harnstoffsynthese verringert, indem Ammoniumionen über die GlDH-Reaktion in Glutamat eingebaut werden (237). In ähnlicher Weise läuft die vorübergehende Speicherung von NH_3 in Alanin und Aspartat ab, die nach hohen Dosen von NH_4Cl beobachtet werden kann (46, 47).

Ob die GlDH generell in Konkurrenz zum Harnstoffzyklus steht, wie von Mendes-Murao et al. (237) vermutet, oder bevorzugt in ihrer klassischen Rolle (vgl. (43, 60)) der Bereitstellung von Ammoniumionen dient, ist zur Zeit Gegenstand heftiger Kontroverse (64, 237, 306, 348). Als alternative Quelle für Ammoniumionen wurde von McGiven (224) der Purin-Nukleotid-Zyklus vermutet. Auf Grund neuerer Untersuchungen ist es jedoch unwahrscheinlich, daß dieser in der Form, wie er von Löwenstein für den Muskel postuliert wurde (209), in der Leber tätig ist.

Auf eine mögliche Rolle von Glutamin als interorganellem Stickstofftransportmetabolit und extra- wie intrahepatischer NH_3-Quelle, sowie auf die Beteiligung der Glutaminsynthese an der NH_3-Fixierung in Konkurrenz zum Harnstoffzyklus wurde weiter oben bereits eingegangen.

Neben solcher Kontrolle auf der Ebene der Metabolitspiegel ist bei der Kurzzeit-Regulation vermutlich auch die periodische Induktion der Argininosuccinat Synthetase beteiligt (162). Letzteres Ergebnis kann als gewichtiges Argument dafür betrachtet werden, daß die Argininosuccinatsynthese als der limitierende Schritt des Harnstoffzyklus anzusehen ist. Während diese Ansicht früher weitgehend geteilt wurde (72, 226), vermutete in jüngster Zeit die Mehrzahl der Autoren die Bildung von Carbamoylphosphat als langsamste und am besten regulierte Teilreaktion (125, 234). In diesem Zusammenhang erscheint es jedoch wichtig, darauf hinzuweisen, daß auch eine interorganelle Synthese von Harnstoff in Betracht gezogen werden muß. So besitzt die Niere ausreichende Kapazitäten zur Synthese von Arginin aus Ci-

trullin (41, 176), aber nur wenig Arginase (176). Höchstwahrscheinlich ist die Niere an der Homöostase der Plasma-Argininspiegel beteiligt (235). Aus dieser Sicht wäre es von enormer Bedeutung für die Regulation des Argininspiegels, wenn der Harnstoffzyklus in der Leber unabhängig vor und nach der Synthese von Citrullin regulierbar wäre.

Außer den Metabolitkonzentrationen selbst dürften auch Hormone als regulierende Faktoren bei der Kurzzeit-Adaptation beteiligt sein. Hierbei kommt offenbar dem Glucagon eine mehrfache Rolle zu. Wie an der isoliert perfundierten Leber gezeigt werden konnte, erhöht Glucagon die Abbaugeschwindigkeit von Aminosäuren und steigert auf diese Weise das Substratangebot für die Harnstoffsynthese (219). Diese Wirkung kommt vermutlich primär über eine Stimulation des Aminosäuretransports in die Leberparenchymzellen zustande (171), wird jedoch längerfristig auch durch die induzierende Wirkung von Glucagon auf verschiedene Enzyme des Aminosäurekatabolismus gefördert (Übersicht s. (285)).

Offenbar hat Glucagon jedoch auch einen direkten Effekt auf einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Harnstoffsynthese selbst, wie von Ymazaki und Graetz (405) und von Triebwasser und Friedland (375) in Anwesenheit von einem Überschuß an NH_4Cl gezeigt werden konnte. Es wurde vermutet, daß diese Wirkung durch die Stimulation der mitochondrialen ATP-Synthese (50, 405) oder durch eine Steigerung des mitochondrialen Gehalts an N-Acetylglutamat (375) zustande kommt. Ebenso möglich wäre eine Verringerung des mitochondrialen Ca^{2+} - Konzentration (66, 100).

Die Wirkung von Glucagon konnte durch bislang unbekannte Faktoren aus Rattenserum gesteigert werden (349). Möglicherweise handelt es sich hierbei um Glucocorticoide, die auch einen potenzierenden Einfluß auf die Glucagon-Stimulierung des Aminosäuretransports ausüben (170).

Die Langzeit-Adaptation beruht hauptsächlich auf der Kontrolle der Enzymspiegel. Neben den fünf Enzymen des Harnstoffzyklus selbst, auf die unten gesondert eingegangen werden soll, scheinen auch andere Enzyme hiervon betroffen. So konnte von McGivan et al. (225) gezeigt werden, daß eine Erhöhung des Proteinanteils der Nahrung eine Zunahme der N-Acetylglutamat Synthase bewirkt. Eine ähnliche adaptative Änderung wurde auch für den Glutamat-Carrier der Mitochondrien wahrscheinlich gemacht (223). Auf diese Weise wird zweifellos die Synthesekapazität der Leberparenchymzellen für Harnstoff erhöht. Eine solche Anpassung erscheint notwendwig, da unmittelbar nach einem Wechsel des Proteinanteils einer Diät von 15 % auf 60 % trotz enormer Belastung des Organismus mit Aminosäuren keine ausreichende Syntheserate für Harnstoff allein mit den Mitteln der metabolischen Regulation etabliert werden kann (252).

Die Kenntnisse über die Verzahnung von Kurz- und Langzeit-Regulation, als auch die Vorstellungen über das generelle Zusammenspiel der zahlreichen Regulationsmechanismen sind gegenwärtig jedoch noch sehr lückenhaft. Besonders störend wirkt sich hierbei aus, daß Aussagen über die realen Aktivitäten der Harnstoffzyklusenzyme in den Hepatozyten auf Grund von Messungen in vitro praktisch bedeutungslos sind.

1.5. Adaptive Änderungen der Enzyme des Harnstoffzyklus[1)]

Ein Zusammenhang zwischen Proteinaufnahme durch die Nahrung und der Arginaseaktivität in der Leber wurde erstmals 1939 von Lightbody und Kleinman (200) beschrieben. Auch Ashida und Harper (13) fanden einen Anstieg der Arginaseaktivität als Antwort auf eine proteinreiche Diät. Dieser Befund wurde von Schimke (323) auf alle 5 Harnstoffzyklusenzyme ausgedehnt. Der Aktivitätsanstieg erfolgte bei allen Enzymen in koordinierter Weise und konnte bei der Arginase auf eine Zunahme an Enzymprotein zurückgeführt werden. Ähnliche Aktivitätssteigerungen konnten von Nuzum und Snodgrass (268) in der Leber von Primaten und Menschen nachgewiesen werden. Schimke konnte ferner zeigen, daß der Belastung des Organismus mit Aminosäuren, gleichgültig ob exogenen oder endogenen Ursprungs, eine entscheidende Rolle bei der Adaptation spielt. Neben einer proteinreichen Diät führte auch Hunger, der mit Proteinkatabolismus und hoher Harnstoffausscheidung einhergeht, zu einer Aktivitätserhöhung aller fünf Harnstoffzyklusenzyme, während eine kohlenhydratreiche Diät, unter der Amionosäuremetabolismus und Harnstoffausscheidung vermindert sind, einen Abfall der Aktivitätsspiegel bewirkte (324). Durch Anwendung immunchemischer Methoden konnte für die Arginase der diesen Aktivitätsänderungen zugrunde liegende Mechanismus transparent gemacht werden (326). So wird im Hungerzustand die Degradation dieses Enzyms völlig gestoppt und die

---

1) vgl. zu diesem Thema die Übersichtsartikel von S. Ratner (299) und H. Aebi (3)

Synthese nur leicht gesteigert. Bei einem Wechsel von proteinhaltiger zu proteinarmer Diät hingegen fällt die Synthese vorübergehend stark ab und die Degradation wird gleichzeitig drastisch erhöht. Qualitativ ähnliche, jedoch quantitativ sehr unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Aktivitätsänderungen der Harnstoffzyklusenzyme als Antwort auf Wechsel im Proteinanteil der Nahrung wurden von Das und Waterlow (77) erhalten. Nach Angaben dieser Autoren ist die zur Adaptation nötige Zeitspanne erheblich kürzer als von Schimke (323) berichtet; entsprechend wurden auch wesentlich kürzere Halblebenszeiten für die Enzyme errechnet.

Auf der Suche nach den verantwortlichen Faktoren für die Adaptation der Harnstoffzyklusenzyme wurde von Schimke der Einfluß von Cortisol und einer Adrenalektomie untersucht (325). Cortisol führte einerseits zu einer Induktion der fünf Enzyme und konnte andererseits den Aktivitätsabfall als Antwort auf die Adrenalektomie verhindern. Der Einfluß einer proteinreichen Diät wurde durch Adrenalektomie jedoch nicht verändert. Unabhängig von Schimke kamen McLean und Gurney (226) zu ähnlichen Ergebnissen. Diese Autoren untersuchten ferner den Einfluß von Wachstumshormon, das zu einer geringen Verminderung der Aktivitätsspiegel führte (226).

Da schon lange bekannt war, daß Glucagon eine ausgeprägte Wirkung auf Proteinkatabolismus, Aminosäureabbau und Harnstoffsynthese zeigt (215, 249), untersuchten McLean und Novello (227) den Einfluß der Pankreashormone auf die Enzymspiegel des Harnstoffzyklus. Verabreichung von Glucagon führte zu einem Anstieg

der Aktivitäten von Carbamoylphosphat Synthase, Argininosuccinat Synthetase und Argininosuccinat Lyase, während jene von Ornithin Transcarbamoylase und Arginase nur leicht abnahmen bzw. konstant blieben. Eine ähnliche Aktivitätsverteilung fand sich bei Alloxandiabetes. Insulin bewirkte überraschenderweise ebenfalls eine Aktivitätserhöhung (227). Dieses Ergebnis könnte jedoch durch Glucagon verursacht worden sein, das infolge hypoglykämischen Schocks ausgeschüttet wurde.

Der Einfluß von Glucagon wurde von Snodgrass einige Jahre später erneut untersucht (355). Im Gegensatz zu den Befunden von McLean und Gurney (227) konnte er zusätzlich eine Aktivitätszunahme der Arginase messen. Auf Grund dieser Ergebnisse vermutete Snodgrass, daß Glucagon eine unmittelbare Rolle bei der Regulation der Harnstoffzyklusenzyme spielt (355). Diese Vermutung konnte jedoch zunächst an Leberparenchymzellen in vitro nicht bestätigt werden (201).

Gemeinsames Merkmal aller beschriebenen Versuche ist, daß die Aktivitätsänderungen als Antwort auf die einzelnen Hormone und chirurgischen Eingriffe keine befriedigende Übereinstimmung mit denjenigen zeigen, die als Resultat der physiologischen Adaptationsvorgänge auftreten. Außerdem stellen sie in ihrer Mehrzahl die Existenz einer koordinierten Regulation aller fünf Harnstoffzyklusenzyme in Frage, wie sie von Schimke auf Grund seiner Untersuchungen vermutet worden war (323).

Außer hormonalen Einflüssen, die letztlich indirekte Wirkungen veränderter Metabolitkonzentrationen darstellen, wurde früh-

zeitig die Möglichkeit ins Auge gefaßt, daß die Modulation der Enzymspiegel auch das Resultat einer direkten Einwirkung der Metabolite und Nahrungsbestandteile sein könnte. Die meisten dieser Untersuchungen wurden jedoch am Ganztier durchgeführt und leiden unter der Schwierigkeit, daß die Verabreichung einzelner Metabolite unkontrollierbare und unüberschaubare Veränderungen im gesamten endokrinen System und im Stoffwechsel bewirken kann. Auf derartige Beschränkungen des in vivo Systems, die bereits von Schimke hervorgehoben wurden (325), wird weiter unten ausführlicher eingegangen.

Unter diesem Blickwinkel können die Versuche von Schimke (325) über den Einfluß verschiedener Aminosäuren und Intermediate des Harnstoffzyklus, die zu ausschließlich negativen Resultaten führten, nicht recht überzeugen. Auch der Befund, daß bei Verfütterung einer argininfreien Diät eine etwa zweifache Aktivitätszunahme der vier argininsynthetisierenden Enzyme erfolgt, während die Arginaseaktivität konstant bleibt, hat im wesentlichen nur phänomenologische Bedeutung. Er zeigt insbesondere, ähnlich wie Untersuchungen bei experimenteller Urämie (48) oder portacavalem Shunt (74), daß zahlreiche Bedingungen existieren, unter denen sich die Enzyme des Harnstoffstoffwechsels nicht gemeinsam ändern.

Versuche, die von Schimke - der Übersichtlichkeit wegen - an verschiedenen menschlichen Zellinien durchgeführt wurden, zeigen andererseits, daß hier tatsächlich Einflüsse, beispielsweise von Arginin, nachgewiesen werden können (322). Die Bedeutung dieser Befunde für das Verständnis des Geschehens an der Leber

ist jedoch fraglich, da es sich um transformierte Zellen von teilweise sogar nichthepatischem Ursprung handelt.

In Anbetracht dieser Situation kann festgestellt werden, daß nahezu keine verläßlichen Daten über spezifische und direkte Wirkungen von Aminosäuren bei der Regulation der Enzymspiegel des Harnstoffzyklus vorliegen. In noch stärkerem Maße gilt dies für mögliche Wechselwirkungen von Aminosäuren mit hormonellen Faktoren, deren eigene Rolle bei dieser Regulation ebenfalls noch weitgehend offen ist.

1.6. Modellsysteme für Untersuchungen des Leberstoffwechsels

An mehreren Stellen der vorstehenden Abschnitte wurde deutlich, daß der hohe Grad an physiologischer Komplexität, besonders auch des endokrinen Systems, die Untersuchung der Kontrolle von Enzymspiegeln am Ganztier außerordentlich schwierig gestaltet. Die Entnahme von Hormondrüsen beispielsweise führt nicht nur zu unüberschaubaren Änderungen im Wechselgefüge des endokrinen Systems und des Gesamtstoffwechsels, sondern hat zusätzlich oft eine erhöhte Anfälligkeit der Tiere zur Folge, die weitere experimentelle Eingriffe ausschließt. Besonders nachteilig wirkt sich bei Ganztierversuchen aus, daß nur selten zwischen einer direkten und einer indirekten Wirkung der applizierten Agentien unterschieden werden kann (325). Ferner müssen Hormone und Metabolite in der Regel in pharmakologischen Dosen verabreicht werden, wodurch Zweifel an der physiologischen Relevanz der beobachteten Wirkungen entstehen können. Ein wichtiger experimenteller Nachteil besteht außerdem darin, daß die Ergeb-

nisse durch Verwendung von großen Tierkollektiven statistisch abgesichert werden müssen.

Infolge dieser Unzulänglichkeiten und Nachteile wurde schon frühzeitig versucht, auf in vitro Systeme auszuweichen. Die Methode der isoliert perfundierten Leber kann als eine der erfolgversprechendsten Entwicklungen in dieser Richtung angesehen werden (361). Während einerseits die komplexe Reaktion des Gesamtorganismus auf die eines einzelnen Organs reduziert wird und damit vor allem endokrine Wechselwirkungen ausgeschaltet werden, bleibt andererseits ein funktionsfähiger Gewebeverband erhalten, der noch zu allen leberspezifischen Reaktionen befähigt ist. Daneben eröffnet das kontinuierliche Durchströmen der Leber die Möglichkeit, Konzentrationen - wie überhaupt die gesamte Versorgung - exakt zu kontrollieren und erleichtert es ferner, die Kinetik der untersuchten Prozesse zu erfassen. Diese Eigenschaften machen die isoliert perfundierte Leber zu einem nützlichen Modellsystem für Untersuchungen des Intermediärstoffwechsels. In bezug auf das Studium langfristiger regulatorischer Prozesse, wie sie bei der Kontrolle von Enzymspiegeln auftreten, erweist sich jedoch die relativ kurze Lebensdauer der isolierten Leber von ca. 6 Stunden, die nur unter erhöhtem Aufwand verlängert werden kann (157, 251), als limitierend.

Derselbe Nachteil beschränkt auch die Anwendung zweier weiterer experimenteller Systeme, der Leberschnitte und der isolierten Hepatozyten. Letztere stellen jedoch ein prinzipiell andersartiges Modellsystem dar, da hier die Reduktion der Kom-

plexität um eine Stufe weiter fortgeschritten ist. Die Möglichkeit, die Leber in einheitliche Populationen von parenchymalen und nicht-parenchymalen Zellen aufzulösen, wofür heute erfolgreiche Methoden zur Verfügung stehen (30, 173, 337), schafft die Voraussetzung, den Beitrag der einzelnen Zellpopulationen zu den metabolischen Leistungen des Gesamtorgans zu bestimmen. Ferner läßt sich die unmittelbare Umgebung der Zellen exakt kontrollieren, so daß kinetische Abläufe, insbesondere Transportvorgänge, ohne Einfluß anatomischer Eigenheiten der Leber untersucht werden können. Darüber hinaus eröffnet das System der isolierten Zellen die Möglichkeit intrazelluläre Konzentrationen der verschiedensten Metabolite zu bestimmen und dabei zusätzlich deren Kompartimentierung grob zu berücksichtigen.

An Versuchen, die kurze Lebensdauer der verschiedenen Organpräparate, insbesondere von isolierten Zellen, durch Kultivierung zu verlängern, hat es in der Vergangenheit nicht gefehlt (6, 314).

Ansätze in dieser Richtung, die eine gewisse Bedeutung als Modellsysteme erlangten, waren die Organ- und Explantatkultur, die Kultur foetaler Leberzellen und vor allem die Klonierung von Zellinien. Bei diesen Systemen muß jedoch berücksichtigt werden, daß sie entweder ihre Eigenschaften im Verlauf der Kultivierung drastisch ändern, oder - im Fall der Zellinien - bereits von vornherein durch Transformation viele ihrer ursprünglichen Eigenschaften und Funktionen verloren und teilweise durch neue, nicht organtypische, ersetzt haben. Ungeachtet dieser Limitierung, die eigentlich nur den Rückschluß auf das intakte

Organ beeinträchtigt, waren die Zellinien von großem experimentellem Wert bei der Untersuchung hormoneller Wirkungen, insbesondere bei der Aufklärung molekularer Ereignisse im Zusammenhang mit der Wirkung von Glucocorticoiden (371).

Dem Ziel, Kulturen von Leberparenchymzellen aus adulter Leber zu etablieren, die auch nach längerer Zeit noch charakteristische Eigenschaften der hochdifferenzierten Zellen zeigen, kam man erst in den letzten Jahren durch Ausarbeitung geeigneter Methoden für die Primärkultivierung näher. Ohne an dieser Stelle in eine Diskussion über Möglichkeiten und Grenzen dieses Modellsystems eintreten zu wollen, kann festgestellt werden, daß trotz noch bestehender Schwächen und Mängel die an dieses in vitro System gestellten Erwartungen bereits weitgehend erfüllt wurden.

1.7. Primärkulturen von Leberparenchymzellen

Der Versuch, Parenchymzellen der Leber von adulten Ratten in nicht-proliferierender Kultur zu halten, wurde erstmals 1966 von Watanabe beschrieben (390). In der Folge wurden mehr oder weniger erfolgreiche Ansätze von Alwen und Gallai-Hatchard (8), Iype (154) und Dickson (86) unternommen. Obwohl hier die verschiedensten Kultivierungstechniken erprobt wurden, gelang es nur selten, funktionell intakte Parenchymzellen in größerer Menge länger als drei Tage zu kultivieren. Hauptursache für diese Fehlschläge war höchstwahrscheinlich die schlechte Qualität der zur Kultivierung verwendeten Zellen. Im Gegensatz hierzu

standen für die Kultivierung selbst bereits ausgearbeitete Techniken zur Verfügung, die nur geringfügig modifiziert werden mußten.

Mit der Einführung der Perfusionstechnik zur Isolierung von Hepatozyten mit Collagenase durch Berry und Friend (30) wurden neue Voraussetzungen für die Kultivierung geschaffen. Zwar wurden bei den ersten erfolgversprechenden Kultivierungen von Bissel et al. (35) und Bonney et al. (39) aus Gründen der größeren Anpassungsfähigkeit noch Zellen von regenerierender Leber (nach Teilhepatektomie) verwendet, doch stellte sich bald heraus, daß auch Hepatozyten aus adulten Ratten ohne Vorbehandlung mit guter Ausbeute und großen Überlebenschancen kultiviert werden konnten (14, 110, 273).

Seit diesen aussichtsreichen Anfängen wurden Leberzellkulturen in steigendem Maße und mit gutem Erfolg für Untersuchungen der verschiedenartigsten Stoffwechselleistungen und Funktionen herangezogen. Aus der Fülle von Arbeiten seien hier nur einige Beiträge herausgegriffen, die als richtungsweisend eingestuft werden können. So wurden die Primärkulturen für Studien des Intermediärstoffwechsels (99, 199), der Entgiftungsmechanismen (36, 239, 242) bzw. der Aktivierung von Procarzinogenen (80, 238, 246, 397), sowie der Stoffwechselregulation (112, 274) und Wachstumskontrolle (194, 301, 352) eingesetzt. Obwohl die verwendeten Kultursysteme den Anforderungen dieser Untersuchungen weitgehend genügten, und die gewählten Kulturbedingungen sich als ausreichend erwiesen, erscheint doch - aus mehrfachen Grün-

den - eine grundsätzliche Kritik an der bisherigen Kultivierungspraxis angebracht.

Im allgemeinen wurden für die Primärkultivierung Methoden in leicht abgewandelter Form übernommen, die für die Kultivierung von foetalen Leberzellen und von Zellinien ausgearbeitet wurden. Übernommen wurden dabei auch die Kulturmedien, die in der Regel nach den Kriterien eines optimalen Wachstums für die einzelnen Zellinien zusammengesetzt wurden, und nun andersartigen und zudem nicht-proliferierenden Zellen als Nährmedium dienen mußten. Zwar wurden in Einzelfällen grobe Unzulänglichkeiten (etwa von Waymouth MB 752/1 Medium (391)) beseitigt (272), doch gelangte in der Mehrzahl der Fälle ein völlig unmodifiziertes Medium zur Anwendung. Ansätze, die Kulturbedingungen auf die speziellen Anforderungen von Leberparenchymzellen zu optimieren, gab es fast ausschließlich nur bei der Suche nach einem geeigneten Substratum. So wurden schwimmende Kollagengele (241), Nylon-Netze mit Kollagenmatrix (352) und kollagenbeschichtete Nitrocellulosefilter (317) als Träger eingeführt. Obwohl von den Autoren in mehreren Veröffentlichungen die besondere Eignung dieser Substrata betont wurde (244, 245, 316), können die Belege jedoch nicht recht überzeugen, da es an einer detaillierten vergleichenden Studie fehlt.

Bisher gänzlich unbeachtet blieben bei der Primärkultivierung von Leberparenchymzellen Probleme, die mit der diskontinuierlichen Versorgung der Zellen mit Nährmedium (tägliche Medienwechsel) einhergehen. An erster Stelle steht hierbei die Veränderung der Zusammensetzung des Kulturmediums, die durch die Stoffwech-

selaktivität der Zellen selbst hervorgerufen wird.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lagen nur indirekte Hinweise auf solche Veränderungen vor: oszillierende Enzymaktivitäten der Ornithin Decarboxylase (273) und unterschiedliche Syntheseraten für Harnstoff je nach dem zeitlichen Abstand zum vorangegangenen Medienwechsel (110). Es ist jedoch anzunehmen, daß solche Schwankungen des extrazellulären Milieus generell zu Fluktuationen von Synthese- und Abbauleistungen führen. Hierdurch wird eine Interferenz mit den untersuchten Adaptationsprozessen möglich, was den experimentellen Wert des Kultursystems außerordentlich schmälert. Ferner kommt hinzu, daß hohe nicht-physiologische Substrat- und Effektorkonzentrationen erforderlich werden, um wirksame Konzentrationen über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhalten.

Um die Konstanz des extrazellulären Milieus zu gewährleisten, wurden mehrere Perifusionstechniken für die Kultivierung verschiedener nicht-hepatischer Zellen entwickelt (Literaturübersichten (179, 276)). Vor kurzem wurde von Van der Meer und Tager (380), sowie von Walter et al. (387) die Anwendung ähnlicher Methoden zur Kurzzeitkultivierung von Hepatozytensuspensionen beschrieben. Unter den Bedingungen der Suspensionskultur sind die Hepatozyten im allgemeinen jedoch nur wenige Stunden lebensfähig. Versuche, die Perifusionstechnik auf Monolayerkulturen von Leberparenchymzellen zu adaptieren und zur Langzeitkultivierung zu verwenden, wurden vor dieser Arbeit nicht beschrieben.

1.8. Ziele der vorliegenden Arbeit

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren die Ergebnisse meiner Diplomarbeit über enzymatische und metabolische Eigenschaften von Leberparenchymzellen in Primärkultur (110), sowie allgemeine Überlegungen zur Problematik der bisherigen Kultivierungsmethodik, wie sie im vorausgegangenen Abschnitt gestreift wurden. Der hieraus resultierenden Forderung nach einer Verbesserung des Kultursystems in experimenteller Hinsicht und nach einer verstärkten Anpassung der Kulturbedingungen an spezifische Erfordernisse von kultivierten Leberparenchymzellen sollte in zweifacher Weise Rechnung getragen werden. Einmal sollte ein Kultursystem erarbeitet werden, das das kontinuierliche Überströmen der Zellmonolayer mit Nährmedium (Perifusion) ermöglichte. Zum anderen sollte versucht werden, Umgebungseinflüsse, wie Substratum und Zusammensetzung des Kulturmediums, so zu gestalten, daß möglichst optimale Resultate hinsichtlich der Lebensfähigkeit und metabolischen Stabilität der Zellen in der Kultur erhalten werden konnten.

Die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der diskontinuierlich kultivierten und perifundierten Hepatozyten sollten an Hand der morphologischen Entwicklung und insbesondere ihrer Stoffwechseleigenschaften in Teilbereichen des Aminosäure- und Stickstoffmetabolismus herausgearbeitet werden. Über diese vergleichende Charakterisierung der verschiedenartig kultivierten Zellen hinaus sollten diese für Untersuchungen zur hormonellen Regulation von Enzymspiegeln genutzt werden. In Beziehung zu den untersuchten metabolischen Leistungen wurden hierfür die Glutamin-Synthe-

tase und die Enzyme des Harnstoffzyklus ausgewählt. Diese Untersuchungen sollten einerseits herrschende Unklarheiten und Widersprüche bezüglich der an der Regulation beteiligten hormonellen und metabolischen Faktoren beseitigen und klären, andererseits erste Einblicke in das Zusammenwirken dieser Faktoren und hierbei wirksame molekulare Abläufe geben.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

Es wurden männliche Ratten der Rasse Sprague-Dawley mit einem Körpergewicht von 200 bis 320 g verwendet. Die Tiere erhielten Altromin^{R}-Futter und Wasser ad libitum.

2.2. Geräte

Sonifier B-12	Branson Sonic Power Cor. (Danbury, USA)
Dounce-Homogenisator	Braun (Melsungen)
Membranfiltrationsgerät	Sartorius (Göttingen)
Rührzelle UP 110/0	Schleicher & Schüll (Dassel)
Dampfdruck-Osmometer	Knauer (Oberursel)
Plattenoxygenator	Eschweiler (Kiel)
Luftstrominkubator	Zeiss (Oberkochen)
Inverses Mikroskop (Diavert)	Leitz (Wetzlar)
Aminosäureanalysator Typ Unichrom	Beckman Instr. (München)
Autoklav FO/3-Z1	Fedegari-Pavia (Italien)
CO_2-Brutschrank	Heraeus (Osterode)
Sterile Werkbank "Laminar Air Flow" (Horizontalstrom)	Centronic (Berlin)
Sterile Werkbank (Vertikalstrom)	Ceag (Bork)

2.3. Verbrauchsmittel

2.3.1. Materialien

Dowex 1 x 8 , 200 - 400 mesh (Cl-Form)	Serva (Heidelberg)
Plastik Petrischalen	Greiner (Nürtingen)
Plastik Petrischalen (vierfach unterteilt)	Falcon (München)
Polyamid-Maschengewebe (100, 150, 200 µm)	Seidengazefabrik Eckert (Waldkirch)
Membranfilter Typ SM 11307, 0,2 µm	Sartorius (Göttingen)
Membranfilter Typ BA 83, 0,2 µm Typ BA 90/20, 0,6 µm	Schleicher & Schüll (Dassel)
Siliconschläuche	Wacker

2.3.2. Chemikalien, Enzyme, Hormone

Aluminimoxid Alcoa A305	Serva (Heidelberg)
Antipyrin	Sigma (München)
Argininosuccinat (Bariumsalz)	" "
Carbamylphosphat	Boehringer (Mannheim)
Desoxyribonukleinsäure (Kalbsthymus)	Sigma (München)
Diacetylmonoxim	EGA Chemie (Steinheim)
Diäthyldithiocarbamat	Sigma (München)
Diphenylamin	Merck (Darmstadt)
Kaiser's Glyceringelatine	" "

Harris Hämatoxilin-Lösung	Merck (Darmstadt)
p-Hydroxyphenylpyruvat	Sigma (München)
α-Isonitrosopropiophenon	" "
Sudanschwarz B	Merck (Darmstadt)
Triäthylphosphat	" "
Trypanblau	Flow Laboratories (Bonn)
L-[U-^{14}C] - Glutamat (265 mCi/mM)	Amersham & Buchler (Braunschweig)
Ornithin Transcarbamoylase	Sigma (München)
Argininosuccinat Lyase	" "
Desoxyribonuclease (Rinderpankreas)	" "
Collagenase Typ I	" "
Collagenase	Boehringer (Mannheim)
Arginase	" "
Trypsin	" "
Dibutyryl-cAMP	Boehringer (Mannheim)
Cycloheximid	" "
Puromycin	" "
Adrenalin	Serva (Heidelberg)
Noradrenalin	" "
Dexamethason	Sigma (München)
Glucagon	" "
Insulin	" "
Prolactin	" "

Trijodthyronin	Sigma (München)
Thyroxin	" "
Wachstumshormon (Schwein)	" "
Human Wachstumshormon (Crescormon)	Kabi (München)

Albumin (Rinderserum) reinst	Behring Werke (Marburg)
Albumin " Franktion V	Roth (Karlsruhe)
Antibiotica	Serva (Heidelberg)
Kälberserum	Seromed (München u. Serva (Heidelberg)
Tryptose Phosphat Bouillon	Flow Laboratories (Bonn)

Alle weiteren verwendeten Substanzen waren analysenreine Produkte der Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München).

2.4. Lösungen und Kulturmedien

2.4.1. Lösungen für die Zellisolation

Für die Isolation von Hepatozyten wurden drei verschiedenartige Lösungen verwendet, das Präperfusionsmedium (PPM), das Perfusionsmedium (PM) und das Isolationsmedium (IM), die alle Modifikationen der von Hank's (137) beschriebenen physiologischen Salzlösung darstellen. Die Zusammensetzung des Präperfusionsmediums und des Perfusionsmediums entsprach dabei weitgehend den Angaben von Ingebretsen und Wagle (150), die des Isolationsmediums denen von Seglen (336). Eine genaue Beschreibung der Zusammensetzung und Herstellung dieser Lösungen wurde von Schirmer (329) gegeben.

Der Grund für die Anwendung uneinheitlicher Medien ist darin zu suchen, daß während der verschiedenen Abschnitte der Zellisolation (Operation des Tieres, Perfusion der Leber und Behandlung der Zellsuspension) unterschiedlich gute Voraussetzungen für die Äquilibrierung der Lösungen mit Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2) bestehen.

2.4.2. W/AB 77 - Medium

Für die Kultivierung wurde ein spezielles synthetisches Medium entworfen, das an der Zusammensetzung von Waymouth's MB 752/1 - Medium (391) orientiert ist, jedoch den besonderen Anforderungen der Primärkultur von Leberparenchymzellen adulter Ratten besser gerecht wird (vgl. 4.1.4.2.).

Die Zusammensetzung dieses Mediums, W/AB 77 genannt, ist in Tabelle 1 angegeben. Bei der Herstellung wurden verschiedene Stammlösungen angesetzt, die jeweils nur einen Teil der Bestandteile enthielten. Das Vollmedium selbst wurde erst unmittelbar vor Gebrauch aus den Stammlösungen bereitet. Damit wurden einerseits Probleme mit der Löslichkeit umgangen und der unterschiedlichen Haltbarkeit der einzelnen Substanzen in wäßriger Lösung Rechnung getragen, andererseits wurde die Möglichkeit geschaffen, ohne größeren Aufwand Konzentrationsänderungen bei gewis-

Substanzen	Konz. mM
NaCl	103,4
KCL	5,23
$MgSO_4 \times 7H_2O$	1,99
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	2,13
KH_2PO_4	0,59
$CaCl_2 \times 2H_2O$	2,0
$NaHCO_3$	25,0
Hepes	10,0

Substanzen	Konz. µM
δ-Aminolävulinsäure	2,0
Ascorbinsäure	59,6
D-Biotin	0,08
D-Ca Pantothenat	2,0
L-Carnitin	1000,0
Cholinchlorid	0,1
Folsäure	0,8
Nikotinamid	8,2
Pyridoxin·HCl	4,9
Riboflavin	3,0
Thiamin·HCl	30,0

Substanzen	Konz. µM
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,004
$FeSO_4 \times 7H_2O$	2,63
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	3,0

Substanzen	Konz. mM
Glucose	5,56
L-Lactat	0,81
L-Pyruvat	0,08
Ölsäure	1,00

Substanzen	Konz. mM
L-Alanin	0,28
L-Arginin·HCl	0,36
L-Asparaginsäure	0,45
L-Cystein·HCl	0,57
L-Glutaminsäure	1,02
L-Glutamin	2,00
Glycin	0,66
L-Histidin·HCl	0,78
L-Isoleucin	0,19
L-Leucin	0,38
L-Lysin·HCl	1,42
L-Methionin	0,33
L-Ornithin·HCl	0,053
L-Phenylalanin	0,30
L-Prolin	0,43
L-Serin	0,24
L-Threonin	0,63
L-Tryptophan	0,20
L-Tyrosin	0,22
L-Valin	0,55

Rinder-Serum-Albumin 41,0 (g/l)

Dem Medium wurde NaOH in einer Konzentration von insgesamt 13 mM zugesetzt, damit beim Äquilibrieren mit 5 % CO_2 in Luft ein pH von 7,4 erreicht wurde.

Tabelle 1: Medium W/AB 77

sen Bestandteilen vorzunehmen.

Stammlösungen

Lösung A: Konzentration: 2-fach
Bestandteile:
1) anorganische Salze, ohne NaCl, $NaHCO_3$, $CaCl_2$ und Spurenelemente
2) Aminosäuren, ohne Cystein und Glutamin
3) HEPES

Die fertige Lösung wurde mit NaOH auf pH 7,4 titriert und der NaOH-Verbrauch festgehalten (s. unten).

Lösung B: Konzentration: 10-fach
Bestandteile:
Vitamine (einschließlich δ-Aminolävulinsäure und D,L-Carnitin), ohne Ascorbinsäure.

Lösung A und B werden steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

Lösung C: Konzentration: 5-fach
Bestandteile:
RSA (entfettet)
$CaCl_2$

Herstellung: Das Rinder-Serum Albumin wird nach den Angaben von Chen (67) durch Behandlung mit Aktivkohle entfettet. Danach wird mit NaOH auf pH 7,4 titriert und der NaOH-Vertrauch notiert. Zusätzlich wird die Proteinlösung mit der gesamten Menge $CaCl_2$ für das fertige Medium versetzt. (Auf diese Weise wird verhindert, daß es bei Herstellung des Vollmediums zum Ausfällen schwerlöslicher Phosphate kommt, da ein Teil des Calciums an das Serum-Albumin gebunden wird.) Die fertige Lösung wird steril filtriert und bei - 20 °C aufbewahrt.

Herstellung des Vollmediums aus den Stammlösungen

Das Vollmedium wird in zwei Teilen angesetzt, dem Hauptmedium (9 Teile) und dem Ergänzungsmedium (1 Teil). Letzteres enthält

das gesamte Natriumbicarbonat, jedoch weder Protein noch oxidationsempfindliche Substanzen. Auf Grund dieser Trennung wird es möglich, das Ergänzungsmedium kurz vor einem Medienwechsel mit CO_2 aufzusättigen, wodurch die Einstellung eines korrekten pH-Werts im Brutschrank wesentlich beschleunigt wird. Zusätzlich dient das Ergänzungsmedium dazu, Schwankungen der Osmolarität, die von Präparation zu Präparation auftreten, auszugleichen. Die Osmolarität des fertigen W/AB 77 Mediums betrug 305 mosmol. (bestimmt mit einem Knauer Dampfdruck Osmometer an Hand einer NaCl-Eichkurve).

Die Herstellung des Hauptmediums erfolgt in mehreren Schritten:

I. In Lösung A werden restliche Substanzen in doppelter Konzentration gelöst:

Cystein	Ascorbinsäure
Glucose	Spurenelemente
Lactat	
Pyruvat	

Die erhaltene Lösung A' sollte sofort weiterverarbeitet werden.

II. Herstellung einer ölsäurehaltigen Lösung von Serum-Albumin

Lösung D: 1 Teil Ölsäureemulsion
2 Teile Lösung C

Die Ölsäureemulsion (Konzentration 10-fach) in Aqua dest. wird mit Ultraschall unter zusätzlichem Erwärmen hergestellt. Um eine Oxidation der Fettsäuren zu vermeiden, sollte möglichst mit entgastem Wasser unter Stickstoff gearbeitet werden. Die Emulsion ist nicht stabil und muß deshalb sofort in Lösung C eingerührt werden.

III. Das Hauptmedium wird wie folgt angesetzt:

5 Teile Lösung A'
3 Teile Lösung D
1 Teil Lösung B

Anschließend wird mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Das Hauptmedium wird steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Ergänzungsmedium:

Bestandteile: $NaHCO_3$ (Konzentration: 10-fach)
NaCl (" variabel)

Die Konzentration an NaCl richtet sich nach der Menge an Natronlauge, die bei Titration der Stammlösungen A und C, sowie dem Hauptmedium auf pH 7,4 verbraucht wurde. Sie wird dabei so bemessen, daß die Konzentration an Natriumionen insgesamt (einschließlich $NaHCO_3$) stets 145 mM beträgt. Auf diese Weise wird ein konstantes Na^+ /K^+- Verhältnis im Medium garantiert.
Das Ergänzungsmedium wird steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

2.4.3. L-15 Medium (modifiziert)

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde mehrfach L-15 Medium (196) zur Kultivierung verwendet. Da dieses in der Orginalzusammenstellung kein Natriumbicarbonat enthält und daher nicht mit CO_2 äquilibriert werden kann, wurde ein Teil des NaCL (25 mM) durch $NaHCO_3$ ersetzt. Ferner war bei dem hier verwendeten Medium Galaktose durch Glucose (5,5 mM), Riboflavin-5-Phosphat durch Riboflavin und Thiaminpyrophosphat durch Thiamin ersetzt. Bei den Experimenten mit der Perifusionskultur wurde zusätzlich 4,1 % Rinder-Serum-Albumin gelöst und der $CaCl_2$-Gehalt auf 2 mM erhöht.

2.4.4. Halbsynthetisches Kulturmedium

Die Kultivierung von Hepatozyten in synthetischen Medien ohne Zusatz von Serum ist zwar im diskontinuierlichen Kultursystem möglich, nicht aber in der Perifusion (vgl. 3.1.1.2. und 4.1.1.4.). Aus Gründen der Einheitlichkeit wurde daher ausschließlich mit serumhaltigem Medium kultiviert.

Unmittelbar vor dem Absetzen der Hepatozyten wurde das endgültige Kulturmedium folgendermaßen angesetzt:

81 % Hauptmedium W/AB 77
9 % Ergänzungsmedium W/AB 77 (oder 90 % L-15 Medium)

10 % Kälberserum
1 % Glutamin-Lösung (200 mM)
0,5% Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 E bzw. 10 mg/100 ml)

In dieser Zusammensetzung wurde das Kulturmedium sowohl zum Absetzen der Hepatozyten als auch während der gesamten Kultivierung verwendet. Für die Perifusion (und bei parallel durchgeführter diskontinuierlicher Kultivierung) wurde der Serumanteil auf 5 % reduziert und dafür der Anteil des synthetischen Mediums erhöht. Bei den Experimenten zur hormonalen Regulation der Glutamin-Synthetase wurde ein Medium verwendet, das nur 2 % Rinder-Serum-Albumin enthielt.

2.4.5. Stammlösungen von Hormonen und Agentien

Dexamethason wurde in Äthanol gelöst und anschließend mit Kulturmedium auf 10^{-4} M verdünnt. Diese Stammlösung ist mindestens 1/2 Jahr haltbar, wenn sie steril bei 4 °C aufbewahrt wird. Bei Zugabe zu den Zellkulturen wurde darauf geachtet, daß die Konzentration an Äthanol im Kulturmedium stets unter 0,02 % lag.

Trijodthyronin wurde entweder in Äthanol oder in 0,1 N NaOH gelöst und mit Kulturmedium verdünnt. Die Stammlösung (1 mg/ml) ist bei 4 °C nur ca. eine Woche haltbar.

Insulin, Adrenalin und Glucagon wurden in wenig 0,1 N HCl aufgenommen und anschließend entweder mit Kulturmedium oder Aqua dest. (Glucagon) verdünnt. Die Konzentrationen der Stammlösungen waren 0,1 mg/ml für Insulin und je 10^{-4} M für Adrenalin und Glucagon. Die Stammlösungen für Insulin und Glucagon wurden mindestens jeden Monat frisch angesetzt; die Lösung mit Adrenalin konnte unter N_2 nur einen Tag aufbewahrt werden.

Human Wachstumshormon wurde nach den Angaben der Hersteller in Saline gelöst. Da diese Lösung zur Stabilisierung Glycin enthält, wurde dieses in gleicher Endkonzentration (2 mM) den Kontrollkulturen zugesetzt. Es wurde jedoch kein Einfluß des Glycins auf die Glutamin-Synthetase beobachtet.

Wachstumshormon vom Schwein wurde in wenig 0,1 N HCl gelöst und ebenfalls mit Saline verdünnt.

Dibutyryl-cAMP und Puromycin wurden direkt im Kulturmedium gelöst, während Cycloheximid zuvor mit 0,1 N HCl aufgenommen wurde. Die Stammlösungen wurden 100-fach konzentriert angesetzt.

2.5. Isolierung von Leberparenchymzellen

2.5.1. Isolierung von Hepatozyten mittels Perfusion

Für die überwiegende Mehrzahl der Versuche wurden die Hepatozyten durch Perfusion der Leber mit Collagenase isoliert. Hierfür wurde die Methode von Berry und Friend (30) in der Modifikation von Ingebretsen und Wagle (150) angewandt. Die Notwendigkeit, die Operation des Tieres, sowie die Präparation von Zellen aus der isolierten Leber unter möglichst aseptischen Bedingungen durchzuführen, machten einige wenige Abwandlungen dieser Methode erforderlich, die eingehend von Schirmer beschrieben wurden (329). Da der Ablauf der in vitro Perfusion in der vorliegenden Arbeit gegenüber diesen Ausführungen leicht abgeändert wurde, sei der Präparationsgang kurz dargestellt.

Die Isolierung des Organs wurde in der von Schirmer (329) angegebenen Weise durchgeführt, wobei die Leber während der Operation durch die Pfortader mit Ca^{2+}-freiem Präperfusionsmedium (PPM, 2.4.1.) durchströmt wurde. Bei dieser offenen Perfusion wurde ein hydrostatischer Druck von ungefähr 60 cm Wassersäule aufrechterhalten. Vor Gebrauch wurde das Präperfusionsmedium bei ca. 30 - 35 °C mit Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2) begast, um eine Übersättigung des Mediums bei Zimmertemperatur zu vermeiden.

Unmittelbar nach Isolierung der Leber wurde das Organ in die Perfusionsapparatur eingehängt, die offene Durchströmung gestoppt und auf einen geschlossenen Kreislauf mit Perfusionsmedium (PM, 2.4.1.) umgeschaltet. Sodann wurden 10 ml sterile Collagenaselösung (Endkonzentration 30 mg/100 ml) zugegeben und Ca^{2+} bis zu einer Konzentration von 1 mM im Perfusat supplementiert. Anschließend wurde 25 bis 30 min. bei 37 °C perfundiert.

Nach Überführung der teilweise rissigen Leber in ein Becherglas mit 50 ml O_2-gesättigtem Isolationsmedium (IM, 2.6.1.) wurde die Leber grob zerkleinert und die Hepatozyten aus den Gewebestückchen ausgeschüttelt. Die so gewonnene Suspension wurde durch eine doppelte Lage Verbandmull und danach durch Polyamid-Maschengewebe von 150 µm Maschenweite filtriert, um größere Zellklumpen und Gewebereste zu entfernen. Anschließend wurde die Zellsuspension zur Abtrennung von Nicht-Parenchymzellen und Zelltrümmern differentiell zentrifugiert. Reihenfolge und Dauer der Zentrifugationsschritte, sowie die Vitalitätsprüfung der gereinigten Parenchymzellsuspension mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau wurden entsprechend den Angaben in meiner Diplomarbeit (109, 110) durchgeführt.

Die Zellausbeute betrug in der Regel 300 - 450 x 10^6 lebende Zellen pro 250 g Ratte; teilweise konnten jedoch bis zu 600 x 10^6 Zellen isoliert werden. Der Vitalitätsindex lag zwischen 85 und 90 %.

2.5.2. Isolierung von Hepatozyten aus Leberschnitten

Einige wenige Versuche zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden mit Hepatozyten durchgeführt, die durch Andauung von Leberschnitten mittels Collagenase isoliert worden waren. Eine genaue Beschreibung dieser Methode wurde in meiner Diplomarbeit gegeben (109) (vgl. (26, 110)). Grundsätzlich ähnelt dieses Verfahren der Methode von Seglen (335), geht jedoch von Leberschnitten aus, die nacheinander einem Ca^{2+}-Entzug mit EGTA und einer Andauung mit Collagenase/Hyaluronidase unterworfen werden. Eine zusätzliche Inkubation mit einem Trypsin/DNAse-Gemisch zur selektiven Beseitigung von trypanblau-anfärbbaren Zellen entsprechend den Angaben in meiner Diplomarbeit (109) wurde nur dann durchgeführt, wenn der Vitalitätsindex unter 90 % lag. Differentielle Zentrifugation und Qualitätstest der Zellsuspension erfolgten in der beschriebenen Weise (109).

2.6. Kultivierung der Hepatozyten

2.6.1. Allgemeine Vorbereitungen

2.6.1.1. Isolierung von Kollagen

Kollagen wurde aus Rattenschwänzen nach der Methode von Loofbourow et al. (207) gereinigt, wobei streng auf aseptische Arbeitsbedingungen geachtet wurde. Ca. 1,5 g Sehnenstränge wurden in der Kälte folgenden Extraktionsschritten unterworfen:

- dreimaliges Waschen mit je 400 ml 10%iger NaCL-Lösung (Dauer 2 - 4 Wochen)
- dreimaliges Waschen mit der gleichen Menge 1/15 M K_2HPO_4-Lösung (Dauer 2 - 4 Wochen)
- Lipidextraktion mit 400 ml Äther (Dauer 1 - 2 Wochen)
- Auflösen des Kollagens mit Essigsäure (1 o/oo) unter intensivem Rühren (Dauer 3 - 4 Tage)

Diese Stammlösung wurde 1 : 8 verdünnt und anschließend auf einer Nutsche über Filterpapier abgesaugt oder in der Druckfiltration filtriert.

2.6.1.2. Beschichten der Kulturgefäße mit Kollagen

Die Beschichtung erfolgte in Anlehnung an die Methode von Michalopoulos und Pitot (241). Pro 19 cm^2 Grundfläche der Kulturgefäße wurden 2 ml Kollagenlösung eingesetzt. Die Petrischalen oder Kulturkammern wurden für mindestens 2 Tage bei 37 °C im Brutschrank unter UV-Bestrahlung inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Gefäße je zweimal mit steriler Hank's-Lösung pH 7,4 mit bzw. ohne 0,5 mM EDTA gewaschen. Beschichtete Petrischalen können für drei bis vier Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.6.1.3. Beschichten der Kulturgefäße mit denaturiertem Rinder-Serum-Albumin

Die Beschichtung der Kulturgefäße mit einem dünnen Film von quervernetztem Rinder-Serum-Albumin wurde nach den Angaben von Macieira-Coelho (214) durchgeführt.

Eine sterile Lösung von RSA (30 %ig) wurde im Eisbad mit dem gleichen Volumen einer 2,5 %igen wässrigen Lösung von Glutaraldehyd versetzt. 2 ml dieser Mischung wurden in eine Petrischale (Ø 85 mm) gegeben und sorgfältig ausgestrichen, damit eine gleichmäßige Schichtdicke erreicht wurde. Die so präparierten Petrischalen wurden 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen, um die Polymerisation zu vervollständigen. Anschließend wurde über Nacht mit 10 ml Borat-Puffer (0,15 M, pH 8,4) überschichtet. Die Petrischalen wurden zweimal mit Hank's-Lösung pH 7,4, die 0,1 % EDTA enthielt gewaschen, und danach jeweils 24 Stunden mit je 10 ml Medium stehen gelassen. Vor der Aussaat der Zellen wurde nochmals mit 2 ml Medium gewaschen.

2.6.2. Diskontinuierliche Kultur

2.6.2.1. Kultivierung in Petrischalen

Das Absetzen der Hepatozyten-Suspension zu Zellkulturen erfolgte unter aseptischen Bedingungen in der sterilen Werkbank. Nach der Quantifizierung wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und auf $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt. Die Menge der Zellsuspension mit der eine Petrischale oder ein Teil derselben beschichtet wurde, war stets so bemessen, daß eine Zelldichte von $0,13 \times 10^6$ Zellen/cm^2 erreicht wurde. Dies entsprach 6 ml bei den normalen Petrischalen mit 85 mm Durchmesser. Die Zellen wurden nach Möglichkeit gleichmäßig verteilt, und die Platten im Brutschrank bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO_2 inkubiert. Nach 3 - 4 Stunden, wenn sich die vitalen Zellen angeheftet und teilweise ausgebreitet hatten, erfolgte der erste Medienwechsel; weitere Wechsel wurden in 24-stündigem Rhythmus durchgeführt.

(Bei einigen frühen vergleichenden Versuchen an beiden Kultursystemen, bei denen Zellen eingesetzt wurden, die nach der Schnittmethode isoliert worden waren, wurde eine abweichende Zelldichte von 0,2 x 10^6 Zellen/cm^2 verwendet. Die Zellsuspension enthielt hierbei 1,5 x 10^6 Zellen/ml. Dies betrifft die Versuche aus den Abschnitten 3.1.3.2., 3.1.3.3. und 3.3.1.)

Im allgemeinen wurde dem Kulturmedium Insulin bis zu einer Konzentration von 2,5 mU/ml zugesetzt. Ausnahmen hiervon sowie der Zusatz von Dexamethason sind bei den einzelnen Versuchen aufgeführt.

2.6.2.2. Inkubation der Zellkulturen in Gegenwart von Hormonen

Zu Beginn einer solchen Inkubation wurde im allgemeinen ein Medienwechsel vorgenommen, mit dem gleichzeitig die Zugabe der Hormone verbunden wurde. Unmittelbar zuvor erfolgte die Verdünnung von Aliquots der Hormonstammlösungen (S. Abs. 2.4.5.) mit Kulturmedium bis zur gewünschten Endkonzentration. Enthielt die Hormonstammlösung nicht-wässrige Lösungsmittel oder andere Beimengungen, so wurden diese in entsprechender Verdünnung dem Kulturmedium für die Kontrollkulturen zugesetzt.

Bei Zugabe von Hormonen im Laufe einer Inkubation wurden Aliquots zwischen 20 µl und 100 µl von geeigneten Verdünnungen der Stammlösungen mit Kulturmedium zupipettiert, wobei die Höchstmenge von 1/50 des vorhandenen Mediums über den Zellen nicht überschritten wurde. Auch hier wurden die Kontrollkulturen entsprechend behandelt.

Für jede solche Manipulation wurden alle Kulturen einer Testserie aus dem Brutschrank genommen, auch wenn diese nur an einzelnen Petrischalen vorgenommen wurde. Damit sollte verhindert werden, daß Schwankungen des pH-Werts, der Temperatur usw. die Ergebnisse unterschiedlich beeinflussen konnten.

Erfolgte die Hormonbehandlung nur während eines begrenzten Zeitraums, so wurden die Kulturen am Ende dieses Intervalls zweimal mit frischem, serumfreien Medium (ohne Ergänzungsmedium)

gewaschen, wobei das Medium jeweils sorgfältig abgesaugt wurde. Anschließend wurden die Hepatozyten in gewohnter Weise weiterbehandelt.

2.6.3. Perifusion

Bei der Perifusionskultur wurde der sequentielle Wechsel des Kulturmediums durch ein kontinuierliches Überströmen der Hepatozyten-Monolayer ersetzt. Gleichzeitig wurde das Medium vor Eintritt in die Kulturkammern mittels Oxygenatoren aktiv mit einem Gasgemisch aus 95 % Luft und 5 % CO_2 begast und nicht - wie bei der diskontinuierlichen Kultur üblich - die Medienoberfläche über dem Zellrasen einer entsprechenden Atmosphäre ausgesetzt. Anordnung und Arbeitsweise entsprechen daher weitgehend der Perfusion eines Organs und stellen im wesentlichen nur eine Adaption auf den speziellen Fall der Monolayer-Zellkultur dar. Eine Gesamtansicht der verwendeten Perifusionsapparatur ist in Abb. 1 gegeben.

2.6.3.1. Aufbau des Perifusionssystems

Die eigentliche Perifusionsapparatur bestand aus der Kulturkammer (a) und einem Versorgungssystem, das sich aus einem Reservoir für Kulturmedium (b), einer Rollenpumpe (c), einem Oxygenator (d) und einem kombinierten Einlaß- und Infusionssystem (e) zusammensetzte (Abb. 2). Eine separate Begasungseinrichtung sorgte für einen konstanten Gasstrom durch den Oxygenator und konnte wahlweise auch zur direkten Einleitung des Gasgemisches in die Kulturkammer verwendet werden.

Alle Verbindungen der einzelnen Geräte untereinander, die mit Medium in Kontakt kamen, waren aus Glas und - für kurze, flexible Anschlüsse - aus Silicongummi, um Toxizitätsprobleme zu vermeiden und eine einfache Sterilisation durch Autoklavieren zu ermöglichen. Gasleitungen bestanden nach Möglichkeit eben-

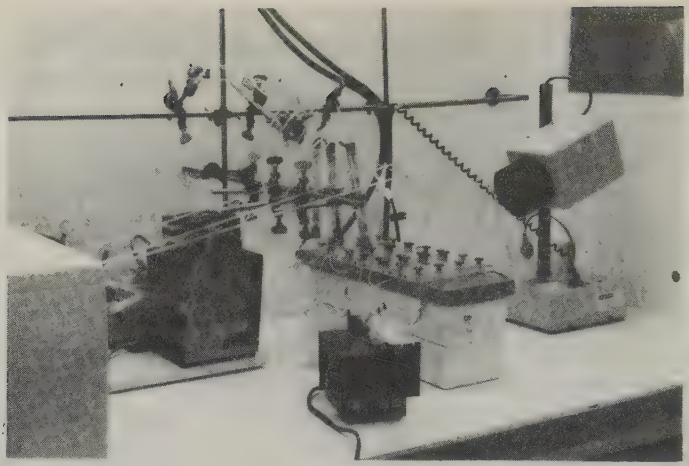


Abb. 1: Gesamtansicht der Perifusionsapparatur mit drei Kulturkammern, den Siliconschlauch-Oxygenatoren und dem Luftstrom-Inkubator.

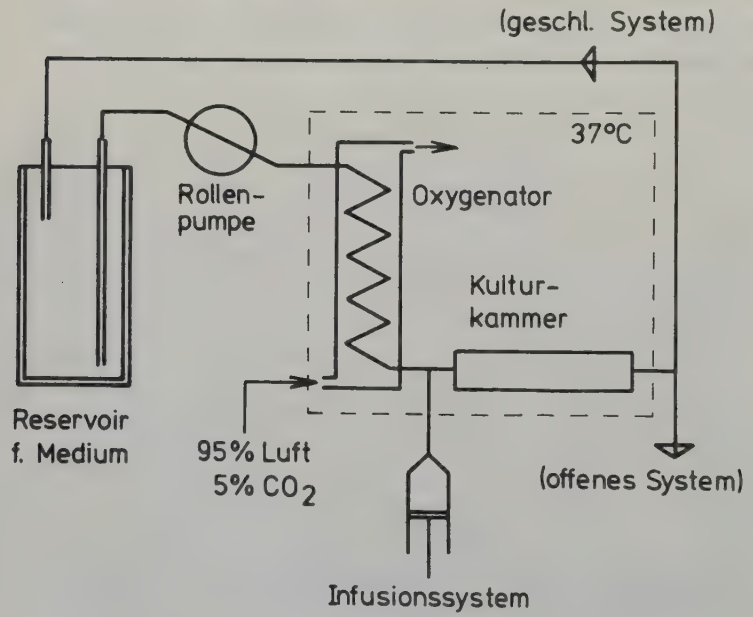


Abb. 2: Schematische Darstellung der Perifusionsapparatur

falls aus Glas oder aus PVC, damit eine Verschiebung der Konzentration des Gasgemisches durch Diffusion möglichst gering gehalten wurde.

a) Kulturkammer

Die Kulturkammer bestand aus einem Plexiglassockel mit Deckel, die von Schrauben zusammengehalten und mit einer Silicondichtung abgedichtet waren (Abb. 3). Das Plexiglas ermöglichte die optische Kontrolle der kultivierten Zellen unter dem inversen Mikroskop, hatte jedoch den Nachteil, daß die Kammern nicht autoklaviert werden konnten.

Beide Stirnseiten waren mit je drei Bohrungen versehen, die mit Gummistopfen abgedichtet waren. Der Anschluß der Kammer an das Versorgungssystem oder die Begasungseinrichtung erfolgte durch Einführen von Injektionsnadeln durch diese Öffnungen. Der eigentliche Kammerboden war mit 5 Objektträgern ausgelegt, die in der Mitte quer unterteilt waren und mit Kollagen beschichtet wurden (s. Abschn. 2.3.1.2.). Sie konnten unabhängig voneinander aus der Kammer entnommen werden. Auf diese Weise war es möglich, repräsentative Teilproben der kultivierten Hepatozyten für die enzymatischen Messungen zu erhalten, ohne die Perifusion insgesamt unterbrechen zu müssen.

Während der einführenden Versuche wurden Kulturfläschchen (Nunc) als Kammern verwendet, die mit je einer Bohrung an den Stirnseiten versehen worden waren, durch welche die Nadeln für Ein- und Auslaß eingeführt werden konnten.

b) Medien - Reservoir

Das Reservoir für frisches Kulturmedium wurde stets eisgekühlt gehalten, um Änderungen in der Zusammensetzung des Mediums (z.B. Hydrolyse von Glutamin) möglichst gering zu halten.

c) Rollenpumpe

Als Pumpe diente eine Gilson-Antriebseinheit mit aufgesetztem 8-Kanal Pumpkopf. Bei sehr umfangreichen Experimenten wurde eine 24 Kanalrollenpumpe verwendet, die in der Institutswerkstatt hergestellt worden war.

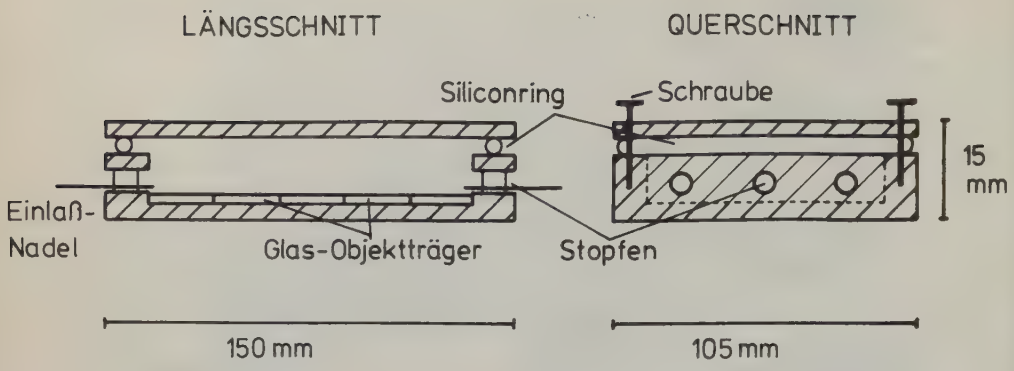


Abb. 3: Schematische Darstellung der Kulturkammer

d) Oxygenator

In allen Fällen, in denen mehrere Kammern parallel mit ein und demselben Medium perifundiert wurden, wurde ein Plattenoxygenator der Firma Eschweiler verwendet.
Bei getrennter Perifusion war jede Perifusionseinheit mit einem eigengefertigten Siliconschlauch-Oxygenator ausgestattet. Der Aufbau ist schematisiert in Abb. 4 wiedergegeben. Das Medium wurde durch einen dünnwandigen Siliconschlauch geleitet, der auf einen Glaszylinder aufgewickelt war. Diese "Spule" war von einem Glasmantel umgeben. Der entstehende Zwischenraum wurde mit der verwendeten Gasmischung äquilibriert. Die Gassättigungscharakteristik ist in Abb. 5 gezeigt. Sie wurde mit einer Sauer-

---

Erläuterung zu Abb. 5: Die Eichung der Scala erfolgte mit Kulturmedium, das mit einem Luft/CO_2-Gemisch (95 %/5 %) intensiv in der Langendorfapparatur begast worden war. (Zum Vergleich ist auch der Sauerstoffgehalt von Medium nach Durchlaufen des Plattenoxygenators (Eschweiler) eingetragen.)
Fließgeschwindigkeit des Mediums: 20 ml/h.

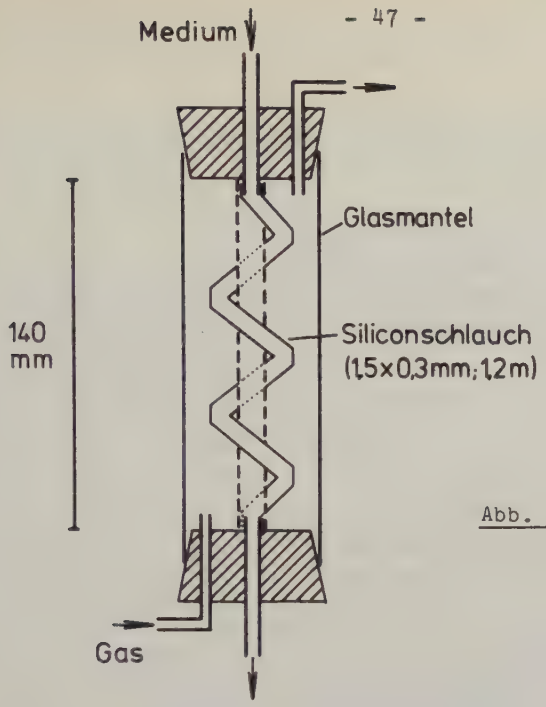


Abb. 4: Aufbau des Siliconschlauch-Oxygenators

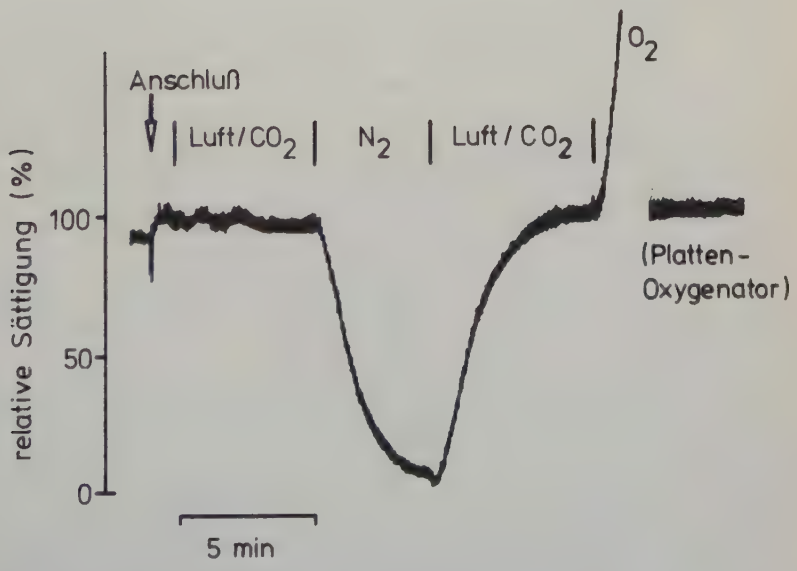


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffaufnahme des Kulturmediums im Siliconschlauch-Oxygenator.
(Erläuterungen s. S. 46)

stoffelektrode bestimmt. Ein besonderer Vorteil dieses Oxygenators bestand darin, daß er im Autoklav sterilisiert werden konnte.

e) Einlaß- und Infusionssystem

Die Verbindung zwischen Oxygenator und Injektionsnadel für den Einlaß wurde durch ein sehr kurzes Stück dünnen Siliconschlauches hergestellt, um Konzentrationsverschiebungen im Gasgemisch durch Diffusion auszuschließen. Unmittelbar vor der Einlaßnadel war ferner eine Infusionsspritze mit zugehöriger Pumpe angebracht, durch die labile Substanzen, etwa Hormone, dem Strom des Kulturmediums beigemischt werden konnten. Für die Einstellung einer bestimmten Konzentration mußten die verschiedenen Flußraten von Medium und Infusat berücksichtigt werden.

2.6.3.2. Arbeitsweise der Perifusion

Die verwendete Apparatur erlaubte eine rezirkulierende und eine offene Perifusion, bei der das Medium nach Passieren der Kulturkammer verworfen wurde. Der erstgenannte Arbeitsmodus wurde zur allgemeinen Kultivierung der Zellen verwendet (Kultivierungsphase). Während dieser Zeit betrug die Flußgeschwindigkeit des Mediums 0,5 ml x h^{-1} x 10^6 $Zellen^{-1}$. Im Vorratsgefäß wurden für die Kultivierungsphase 50 ml Medium pro Kammer und pro 24 Stunden bereitgehalten. Bei längerfristiger Kultivierung erfolgte nach 5 Tagen ein Austausch des Kulturmediums im Vorratsgefäß, jedoch nicht in der Kulturkammer. Auf diese Weise wurde ein abrupter Wechsel des extrazellulären Milieus vermieden.

Die offene Perifusion wurde in der Regel nur während der eigentlichen "Experimentalphase" eingesetzt. Hierbei wurde der Fluß des Mediums aus 0,3 ml x h^{-1} x 10^6 $Zellen^{-1}$ reduziert. Zu Beginn der Experimentalphase wurde im allgemeinen kein Medienwechsel vorgenommen; bei direktem Vergleich mit dem diskontinuierlichen System wurde ein solcher jedoch durchgeführt.

2.6.3.3. Sterilisation der Perifusionsapparatur

a) Kulturkammer

Es wurde schon weiter oben erwähnt, daß die Kulturkammern aus Plexiglas nicht autoklaviert werden konnten. Dies war ein entscheidender Nachteil, der nur durch ein zeitintensives und aufwendiges Sterilisationsverfahren kompensiert werden konnte. Alle Manipulationen wurden in der sterilen Werkbank ausgeführt.

Zur Sterilisation wurden alle Kammerteile für 1 Stunde in Äthanol (70 %) eingelegt (Die Objektträger wurden separat im Autoklav sterilisiert). Dann wurden die Teile in ein Becherglas mit 2,5 l sterilem Aqua dest. überführt und hierin über Nacht stehen gelassen, um den in die Plastik und den Silicongummi eingedrungenen Alkohol zu beseitigen. Anschließend mußten die Kammerteile im Luftstrom der sterilen Werkbank getrocknet und gegebenenfalls letzte Spuren von Wasser abgeflammt werden. Nach Einlegen der sterilen Objektträger und Überschichten mit je 15 ml Kollagenlösung wurden die Kammern verschlossen und im Inkubator mit UV bestrahlt. Die weitere Behandlung entsprach genau derjenigen bei Petrischalen (s. Abschn. 2.6.1.2.).

b) Oxygenator

Ein besonderes Sterilisationsverfahren war nur für den Plattenoxygenator (Eschweiler) notwendig. Hierzu wurden die Membranen und Schlauchanschlüsse für 20 min. in Äthanol (70 %) eingelegt. Anschließend wurde der Oxygenator in noch feuchtem Zustand in der sterilen Werkbank zusammengesetzt. Zur Überprüfung der Sterilität und zum Auswaschen des Alkohols wurde der Oxygenator mindestens 24 Stunden mit sterilfiltrierten Resten von Kulturmedium (50 ml) durchströmt. Zeigte sich während dieser Zeit kein Bakterienwachstum, so konnte das Gerät als steril betrachtet werden.

c) Perifusionseinrichtung

Im allgemeinen wurden die restlichen Teile in fertig zusammengesetztem Zustand autoklaviert. Bei Verwendung der Silicon-

schlauch-Oxygenatoren wurden diese schon vor dem Autoklavieren mit den Zuleitungen für das Kulturmedium verbunden.

2.6.3.4. Kultivierung im perifundierten System

Zur Herstellung von Perifusionskulturen wurden die Zellen in den Perifusionskammern mit derselben Flächendichte abgesetzt wie in den Petrischalen (vgl. Abs. 2.6.2.1.). Hierzu wurden die Kammern mit 10 ml Kulturmedium beschichtet und anschließend im Brutschrank bei 37 °C gehalten oder auf einem entsprechend temperierten Aluminiumblock bei 37 °C inkubiert. Im letzteren Fall sorgte ein Warmluftinkubator (Zeiss) für eine ausreichende Erwärmung der Kammeroberseite. Unmittelbar danach wurde durch die Kulturkammern ein Gasstrom aus 95 % Luft und 5 % CO_2 geleitet, um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und eine exakte Einstellung des pH-Wertes zu gewährleisten. Dieser Gasstrom mußte zuvor mit Wasser gesättigt werden, da sonst größere Verluste an Flüssigkeit im Kulturmedium durch Verdunsten auftraten. Nach ungefähr 4 Stunden wurde der Gasstrom abgestellt, die Kammern geschüttelt und das Kulturmedium zusammen mit Zelltrümmern und toten Zellen gegen frisches Medium ausgetauscht. Dann wurde die Perifusion durch einfaches Einstechen der Injektionsnadeln für Ein- und Auslaß in die hierfür vorgesehenen Öffnungen gestartet und die Pumpe eingeschaltet. Die Gaszufuhr erfolgte nunmehr über den Oxygenator, der ebenfalls bei 37 °C gehalten wurde, um das Medium vorzuwärmen und eine Übersättigung mit Gas zu vermeiden. Es wurde streng darauf geachtet, daß der Spiegel des Mediums im (offenen!) Vorratsgefäß auf gleicher Höhe stand wie in der Kammer, um die Zellen nur geringem hydrostatischen Druck auszusetzen.

Bei einigen Langzeitversuchen wurde die einleitende Adaptationsperiode ohne Durchströmen mit Medium auf insgesamt 20 Stunden ausgedehnt, wobei jedoch nach 4 Stunden ein Austausch des Mediums vorgenommen wurde. Entsprechende Änderungen sind bei den betreffenden Versuchen erwähnt. Abweichend mit diesen Angaben wurde bei einigen frühen Perifusionen (vgl. Abs. 2.6.2.1.)

eine Flächendichte von 0,2 x 10^6 Zellen/cm^2 eingesetzt. Ferner wurden die Kammern mit 15 ml Medium beschickt und mit Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2) begast. Die eigentliche Perifusion nach 4 oder 20 Stunden wurde jedoch auch hier mit 10 ml Medium pro Kammer durchgeführt.

2.6.3.5. Spezielle Inkubationsprotokolle für die Perifusion

Die vergleichenden Untersuchungen an diskontinuierlich kultivierten und perifundierten Hepatozyten machten manchmal gewisse Abweichungen vom normalen Verlauf der Perifusion erforderlich, damit die Ergebnisse einander unmittelbar gegenübergestellt werden konnten.

a) Vergleich der Syntheseraten von Harnstoff (Abschn. 3.1.3.2.)

Für diesen Versuch wurden drei Kulturkammern eingesetzt, wovon eine mit L-15, die beiden anderen mit L-15, das 10 % TPB enthielt, perifundiert wurden. Am 2., 5. und 10. Kulturtag wurde frisches Kulturmedium zugegeben, wobei auch das Medium der Kammern ausgetauscht wurde. In das Medium für eine der beiden mit L-15/TPB perifundierten Kammern wurde zusätzlich NH_4Cl-Lösung infundiert (Endkonzentration 4 mM). Während einer zweistündigen offenen Perifusion wurde das Medium gesammelt und anschließend darin die gebildete Menge Harnstoff bestimmt. Danach wurde wieder auf den geschlossenen Kreislauf umgeschaltet und die Infusion von NH_4Cl gestoppt.

b) Präperifusion mit Dexamethason bei Experimenten zur Induktion der Harnstoffzyklusenzyme durch Glucagon (Abschn. 3.3.3.)

Hepatozyten in drei Kulturkammern wurden im geschlossenen System bei gleichzeitiger Kopplung der Kammern für 34 Stunden perifundiert. Anschließend wurde sechs Stunden lang offen perifundiert, die Kopplung der Kammern jedoch beibehalten. Während dieser Zeit wurde eine Kammer zusätzlich mit Dexamethason (Endkonzentration 10^{-7} M) infundiert. Nach dieser Vorinkubation wurden die Kammern getrennt und mit oder ohne Infusion von

Glucagon 20 Stunden lang offen perifundiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Enzymaktivitäten in den Zellhomogenaten bestimmt.

2.7. Histochemische und cytologische Verfahren

2.7.1. Fixierung der Zellkulturen

a) Für die Färbung der Zellkulturen mit Haematoxilin/Eosin wurden die Kulturen mehrmals vorsichtig mit NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen und dann 5 min. mit 4 ml eines Eisessig-Alkohol-Formalin-Gemisches (5:85:10) fixiert. Die Fixierlösung wurde mit Aqua dest. ausgewaschen.
b) Die Fixierung der Hepatozyten für die Lipidfärbung erfolgte nach Baker (16). Die intensiv gewaschenen Kulturen (0,9 % NaCl) wurden für mehrere Stunden in die Fixierlösung eingelegt und dort gegebenenfalls bis zur Durchführung der Lipidfärbung aufbewahrt.

Fixierlösung: 10 ml Formalin (37 %)
10 ml $CaCl_2$-Lösung (10 %)
ad 100 ml Aqua dest.

Zur Neutralisierung wurde ein Kreidestück zugegeben. Die Lösung muß vor Gebrauch mehrere Tage stehen.

2.7.2. Anfärbung der Zellkulturen mit Haematoxilin

Für die morphologische Begutachtung der Hepatozytenkulturen wurden diese in der folgenden Weise eingefärbt:
An fixierten (Abschn. 2.4.1.a) und gewaschenen Kulturen erfolgte zuerst die Anfärbung der Zellkerne mit 3 ml Harris Haematoxilin-Lösung, die nach 2,5 min. mit Aqua dest. wieder ausgespült wurde. Anschließend wurden die Präparate für weitere 5 min. unter Aqua dest. stehengelassen. Die übrigen Zellbestandteile wurden mit 4 ml einer 0,5 %igen alkoholischen Eosin-Lösung angefärbt, die nach 1 min. durch Auswaschen mit absolutem Alkohol entfernt wurde. Während der Beobachtungszeit wurde das Präparat verschlossen unter Isoamylalkohol gehalten.

2.7.3. Lipidfärbung mit Sudan Schwarz B

Die Lipidfärbung wurde nach den Angaben von Lison und Dagnelie (205) wie folgt durchgeführt:
Die fixierte Zellmonolayer (s. Abschn. 2.4.1.b) wurde mit Aqua dest. gewaschen und kurz in Triäthylphosphat (60 %) eingelegt. Die Einfärbung erfolgte für 10 min. mit Färbelösung bei Zimmertemperatur. Anschließend wurde für 30 Sekunden mit Triäthylphosphat (60 %) gespült und sofort mit Aqua dest. nachgewaschen. Die Präparate wurden mit Glyceringelatine eingedeckt.
Herstellung der Färbelösung:
Zu 60 ml Triäthylphosphat wurden 40 ml Aqua dest. gegeben und hierin 1 g Sudan Schwarz B durch Erhitzen auf 100 °C für mehrere Minuten aufgelöst. Die noch heiße Lösung wurde abfiltriert. Vor Gebrauch mußte die Lösung stets erneut filtriert werden.

2.7.4. Zählung der Zellkerne

Die Anzahl der kultivierten Hepatozyten wurde durch Auszählen der Zellkerne ermittelt. Dazu wurden die Kulturen kurz mit NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen, mit 1 ml 0,1M Zitronensäure-Lösung, die 0,1 % Kristallviolett enthielt, versetzt und anschließend für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt. In kurzen Abständen wurden die Kulturen geschüttelt oder die Inkubationslösung mittels einer Pasteur-Pipette heftig auf- und abgesaugt. Die Zellkerne wurden in einer Neubauer - Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Bei der Berechnung der Zellzahl wurde der prozentuale Anteil mehrkerniger Zellen berücksichtigt (393).

2.8. Biochemische Messungen

2.8.1. Aufbereitung der Zellkulturen

Zur Durchführung von biochemischen Messungen wurden die Zellkulturen zweimal mit 0,9 % NaCl gewaschen und die Zellen nach Zugabe von 1 ml 0,075 M KCl-Lösung mit einem Gummischaber von der Unterlage gelöst. Anschließend wurden die Hepatozyten un-

ter Eiskühlung homogenisiert. Dies erfolgte entweder mit einem Dounce-Homogenisator (mind. 100 Durchgänge) oder, gegen Ende der Arbeit, durch Ultraschall (Branson-Sonifier B-12, Stufe 3, 25 sec.).
Für die enzymatischen Bestimmungen wurden die Zellhomogenate mit ca. 8 000 g zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge).

2.8.2. Proteinbestimmung

Die Bestimmung von Protein erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (210). Aliquots von 20 µl der Gewebe- oder Zellhomogenate wurden ohne vorherige Zentrifugation in den Test eingesetzt.
Proteinstandards mit Rinderserumalbumin (1 µg/ml) wurden bei jeder Testserie mitgeführt.

2.8.3. DNS-Bestimmung

Für die quantitative Erfassung der DNS im Zell- bzw. Leberhomogenat wurden zwei kolorimetrische Verfahren, die Reaktion mit Indol nach Ceriotti (58) und die Umsetzung mit Diphenylamin nach Burton (52) erprobt. Beide Meßverfahren beruhen auf der Bestimmung von Desoxyribose bzw. deren Phosphatestern, die bei Hydrolyse von DNS im sauren Milieu entstehen, und werden in unterschiedlichem Ausmaß durch andere Zucker, Zuckereinheiten aus Glykoproteinen und anderen, meist niedermolekularen Stoffen gestört. Um derartige Interferenzen mit den Bestimmungen zu reduzieren, muß die DNS zuvor einer partiellen Reinigung unterworfen werden, für die zwei verschiedene Methoden angewandt wurden:

a) Trennungsgang nach Schmidt-Thannhauser

Die partielle Reinigung nach Schmidt-Thannhauser (331) umfaßt die Abtrennung von säurelöslichem Material durch Fällung von DNS und Protein mit kalter Säure, Extraktion von Lipiden und anschließender Zerstörung von RNS durch Kochen in alkalischem Milieu. Nach erneutem Ausfällen mit $HClO_4$ wird die DNS

in schwach alkalischem Milieu gelöst und in dieser Form für die Bestimmung eingesetzt.
Diese Methode wurde nach der Modifikation von Munro und Fleck (261) wie folgt durchgeführt, wobei auf die Extraktion der Lipide verzichtet wurde:
5 ml Homogenat von Fischleber (1:20; w, v) oder Zellsuspension (2 - 4 x 10^6 Zellen/ml) wurde unter Eiskühlung mit 2,5 ml kalter 0,6N $HClO_4$ versetzt. Nach 10 min. wurde mit 6000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit eiskalter 0,2 N $HClO_4$ gewaschen und durch Abtropfen von anhaftender Flüssigkeit befreit. Nach Zugabe von 4 ml 0,3 N KOH wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, anschließend im Eisbad gekühlt und Protein und DNS mit 2,5 ml 1,2 N $HClO_4$ erneut gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (6000 g) und zweimal mit 0.2 N $HClO_4$ gewaschen. Für die nachfolgende kolorimetrische Bestimmung nach Ceriotti (58) wurde die DNS mit 0,5 ml 0,3 N KOH unter kurzem Erwärmen auf 37 °C gelöst und diese Lösung mit 1 ml H_2O verdünnt. Bei Anwendung der Methode von Burton (52) wurde in derselben Lösung eine Perchlorsäurekonzentration von 0,4 N eingestellt und 20 min. bei 90 °C erhitzt.

b) Trennungsgang nach Schneider

Das Verfahren nach Schneider (332) unterscheidet sich von dem vorstehenden dadurch, daß im Anschluß an die Lipidextraktion sowohl DNS als auch RNS durch Einwirkung von heißer Säure hydrolysiert, und der jeweilige Gehalt durch selektive Bestimmung von Desoxyribose bzw. Ribose bestimmt wird. Diese Methode wurde in der vereinfachten Form nach Bonney et al. (39) durchgeführt:
5 ml Homogenat von Frischleber oder Zellsuspension (Konzentration siehe (a) wurde im Eisbad mit 2,5 ml einer Mischung aus 15 % TCA und 2 N HCl versetzt. Dann wurde mit 6000 g zentrifugiert und der Niederschlag mit 8 % TCA gewaschen. Die Hydrolyse erfolgte in 4 ml 5 % TCA bei 90 °C für 25 min. Vor Durchführung des kolorimetrischen Tests wurde die Lösung mit $HClO_4$ versetzt (Endkonzentration 0,4 N).

Durchführung der kolorimetrischen Bestimmungen:

a) Reaktion mit Indol nach Ceriotti (58)

Indol-Reagenz: 0,04 % Indol in Aqua dest. (Das Indol wurde unter Erwärmen auf 55 °C gelöst; die fertige Lösung ist bei 4 °C gut haltbar.)
Bei dieser Methode sollte die Konzentration der DNS zwischen 2,5 und 15 µg/ml liegen.
1 ml der DNS-Lösung wurde mit 0,5 ml Indol-Reagenz und 0,5 ml konzentrierter HCl versetzt, gemischt (Vortex) und verschlossen 10 min. im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde viermal mit Chloroform extrahiert, anschließend bis zur klaren wässrigen Phase zentrifugiert. Die Messung erfolgte bei 490 nm gegen Leerwert.

b) Reaktion mit Diphenylamin nach Burton (52)

Diphenylamin-Reagenz: 1,5 g Diphenylamin wurden in 100 ml destilliertem Eisessig gelöst und 1,5 ml konz. H_2SO_4 zugegeben. Diese Lösung wurde im Dunkeln aufbewahrt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden pro 10 ml Reagenz 50 µl wässriger Acetaldehyd (16 mg/ml) zugesetzt.

Die Konzentration der DNS sollte 0,1 bis 1,2 µg/ml betragen. Ferner sollte die Lösung 0,4 - 0,5 N $HClO_4$ enthalten. 1 ml dieser Lösung wurde mit 2 ml fertigem Diphenylamin-Reagenz versetzt und bei 30 °C für 20 Stunden inkubiert. Die Extinktion wurde bei 600 nm gegen Leerwert gemessen.

Die eigentlichen kolorometrischen Nachweisverfahren wurden sowohl mit Zellhomogenat (mit und ohne Zusatz einer Standardlösung) nach vorheriger Durchführung der oben beschriebenen Partialreinigungen, als auch mit der Standardlösung direkt auf Linearität getestet. Für die Bestimmung der DNS-Konzentration aus der gemessenen Extinktion wurden folgende Beziehungen ermittelt:

Ceriotti: $c = E \times 9{,}68$ [µg/ml]
Burton: $c = E \times 1{,}15$ [µg/ml]

Der Wiederfindungsgrad bei den Trennungsverfahren betrug:

Schmidt-Thannhauser: 83 %
Schneider : 95 %
Standardlösung von DNS aus Kalbsthymus:
Die Stammlösung enthielt 15 µg DNS/ml in 0,1 N KOH und wurde bei 4 °C aufbewahrt.
Hiervon wurden Aliquots abgenommen, entsprechend den Erfordernissen der Nachweisverfahren verdünnt und im Fall der Bestimmung nach Burton eine Konzentration von 0,4 N $HClO_4$ eingestellt.

2.8.4. Metabolitbestimmungen

2.8.4.1. Aufbereitung des Kulturmediums zur Bestimmung von Metaboliten

Zur Deproteinisierung wurden 2 Teile Kulturmedium zu einem Teil 1,2 N $HClO_4$ pipettiert und für 10 min. im Eisbad stehengelassen. Anschließend wurde bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand mit 5 M K_2CO_3-Lösung neutralisiert.
Das Entweichen von CO_2 wurde durch kräftiges Mischen (Vortex) beschleunigt. Nach erneutem Stehen im Eisbad für 10 min. wurde wiederum bei 2000 g zentrifugiert. Aliquots des Überstands wurden für die Metabolit-Bestimmungen eingesetzt. Für die Durchführung der Aminosäureanalyse war es unerläßlich, zusätzlich die Lipide aus dem Kulturmedium zu entfernen. Hierzu wurde neutrales, deproteinisiertes Kulturmedium mit Chloroform in gleichen Teilen gut gemischt und anschließend zur besseren Trennung der Phasen zentrifugiert.

2.8.4.2. Aminosäureanalyse

Die schonende Aufbereitung des Kulturmediums erlaubte prinzipiell die Analyse aller im Kulturmedium enthaltenen Aminosäuren. Dies gilt auch für Glutamin, das bei ständiger Aufbewahrung der Proben bei 0 °C oder in geforenem Zustand kaum hydrolysiert. Schwierigkeiten bei der automatischen Analyse des Kulturmediums ergaben sich besonders durch den hohen Lipidgehalt. Hier konnte durch Ausschütteln mit Chloroform bei der Probenaufbereitung

Abhilfe geschaffen werden. Eine weitere Störquelle war in den teilweise stark differierenden Konzentrationen der Aminosäuren zu suchen. So kam es etwa bei frischem Kulturmedium zu einer Überlagerung des Glutamin-Peaks mit den Peaks von Threonin oder Serin. Die Konzentrationen von Threonin oder Serin konnten infolgedessen erst nach der enzymatischen Bestimmung von Glutamin auf rechnerischem Wege ermittelt werden. Ähnlich war es bei dem Paar Glutamat/Prolin. Aus diesem Grund wurde auf eine quantitative Analyse von Prolin verzichtet.

Wurde eine Aminosäureanalyse mit Kulturmedium durchgeführt, das zuvor mit Wachstumshormon supplementiert worden war, so wurde der Nachweis von Alanin durch den hohen Glycin-Peak (als Beimengung zu Wachstumshormon, s. Abschn. 2.4.5.) gestört. Die Alanin-Konzentration wurde in diesen Fällen enzymatisch ermittelt.

Die automatisch durchgeführte Trennung der Aminosäuren erfolgte nach dem Einsäulen-Verfahren an einem Beckman Aminosäure-Analysator (Typ Unichrom). Der Nachweis der Aminosäuren wird durch die quantitative Reaktion mit Ninhydrin ermöglicht, das kontinuierlich in das Eluat eingespeist wird. Die Asporption wird bei 570 nm und für Prolin bei 440 nm in mehreren Durchflußküvetten gemessen und mit einem Mehrkanalschreiber aufgezeichnet. Ein Integrator (Typ Minigrator von Spetraphysics mit T-E-Wandler) berechnet die Fläche der Peaks. Die Umrechnung der Flächen in molare Mengen der einzelnen Aminosäuren erfolgt an Hand von Eichwerten, die mit Hilfe einer Aminosäure-Eichmischung gewonnen werden.

2.8.4.3. Enzymatische Bestimmung von Alanin

Die Bestimmung von Alanin wurde im gekoppelten Test mit Glutamat-Pyruvat-Transaminase und Lactat-Dahydrogenase nach der Methode von Graßl (118) durchgeführt. Die Inkubation des Testansatzes erfolgte bei 37 °C für 60 min., damit in allen Fällen der Endwert der Reaktion voll erreicht wurde. Die Konzentration wurde aus der Extinktion bei 340 nm an Hand einer Eichkur-

ve ermittelt, die nach Zusatz von Alanin im Kulturmedium aufgenommen wurde.

2.8.4.4. Enzymatische Bestimmung von Glutamin

Die Bestimmung von Glutamin im Kulturmedium erfolgte nach der Methode von Mecke (231) im photometrischen Test. Das Prinzip des Tests beruht auf der Umsetzung von Glutamin mit Hydroxylamin durch die Glutamin-Synthetase. Das bei der Reaktion entstehende γ-Glutamylhydroxamat bildet mit Eisen (III)-Salzen einen gefärbten Komplex, dessen Konzentration photometrisch bei 500 nm bestimmt werden kann.
Für die Bestimmung wurde die Glutamin-Synthetase aus E. coli verwendet, da dieses Enzym eine besonders hohe Aktivität in dieser Transfer-Reaktion besitzt. Die Isolation des Enzyms sei nachfolgend beschrieben:

2.8.4.5. Isolation der Glutamin-Synthetase aus E. coli

Die Reinigung erfolgte nach den Angaben von Mecke et al. (229) aus E. coli Bakterien. Diese wurden in einer Nutrient-Broth-Lösung vorkultiviert und nach Überimpfen auf einem ammoniumfreien Kulturmedium bestehend aus 136 g KH_2PO_4, 35 g KOH, 20 g Na-Glutamat, 20 g Glycerin, 2 g $MgSO_4$ und 5 mg $FeSO_4$ in 10 l Wasser herangezogen.

Nach ungefähr zwei Tagen wurden die Zellen bei 15 000 g abzentrifugiert und mit Alcoa aufgeschlossen (230). Durch Extrahieren mit 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,2 und Zentrifugieren bei 35 000 g wurde ein Rohextrakt gewonnen. Die Ausfällung der Nucleinsäuren erfolgte mit 0,074 M Streptomyzinsulfat (25 ml auf 100 ml Rohextrakt). Inaktives Protein wurde bei pH 5,0 durch Zugabe von 0,1 N Essigsäure ausgefällt. Die Fällung des Enzyms wurde durch weiteren Zusatz von Essigsäure bis pH 4,4 erreicht. Der Enzymniederschlag wurde in 0,1 M Trispuffer (pH 7,7) gelöst, mit 1 mM $MgSO_4$ versetzt und einer Hitzedenaturierung (10 min. bei 60 °C) unterworfen. Die zentrifugierte

Lösung enthielt das Enzym mit einer spezifischen Aktivität von ungefähr 7000 Units und wurde in dieser Form direkt für den Glutamintest verwendet.

2.8.4.6. Die Bestimmung von Harnstoff im Kulturmedium

Der Gehalt von Harnstoff im Kulturmedium wurde der hohen Spezifität wegen enzymatisch bestimmt. Der gekoppelte Test mit Urease und Glutamat-Dehydrogenase wurde nach den Angaben von Gutmann und Bergmeyer (128) durchgeführt. Da der Gehalt des Kulturmediums an Ammoniak sehr variabel und teilweise ziemlich hoch ist, wurde jede Probe dreimal gemessen.

2.8.5. Aktivitätsbestimmungen von Enzymen

2.8.5.1. Bestimmung der Tyrosin Aminotransferase

Die Enzymaktivität wurde nach der Methode von Diamondstone (85) bestimmt.

Dem Test liegt als Prinzip die Übertragung des α-Aminstickstoffs auf α-Ketoglutarat und die nachfolgende Umwandlung des entstehenden p-Hydroxyphenylpyruvats in p-Hydroxybenzaldehyd in stark alkalischer Lösung zugrunde. Die Extinktion des Reaktionsprodukts wurde bei 331 nm gemessen.
Die Eichung des Test erfolgte mit käuflichem p-Hydroxyphenylpyruvat.

Entgegen den Angaben von Diamondstone war der Zusatz von DDC zum Test auch noch nach längerer Aufbewahrung der Homogenate notwendig, um die p-Hydroxyphenylpyruvat Oxidase zu hemmen. Die Homogenate konnten für mindestens vier Tage eingefroren werden, ohne daß ein Verlust an Enzymaktivität festgestellt werden konnte.

2.8.5.2. Bestimmung der Glutamat-Oxalacetat Transaminase

Die Bestimmung der Glutamat-Oxalacetat Transaminase wurde nach Bergmeyer und Bernt (27) durchgeführt. Pro Ansatz wurden

für den UV-Test nur halbe Mengen der Testreagentien eingesetzt.

2.8.5.3. Bestimmung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase

Die Durchführung des UV-Tests erfolgte nach Bergmeyer und Bernt (28), wobei pro Testansatz nur halbe Mengen der Testreagentien eingesetzt wurden.

2.8.5.4. Bestimmung der Glutamin-Synthetase

Die Aktivität der Glutamin-Synthetase wurde nach der Methode von Prusiner und Milner (291) in der Modifikation von Becher et al. (25) bestimmt. Hierbei wird in einem Standard-Testansatz die Umwandlung von ^{14}C-Glutamat in ^{14}C-Glutamin bei 37 °C gemessen. Das gebildete Glutamin wurde chromatographisch (Dowex 1x8, Acetat-Form) von Glutamat abgetrennt.

Testmischung für 50 Bestimmungen:

2,5	ml	Tris-HCl	0,8 M (pH 7,8)
0,5	ml	$MgCl_2$	1,0 M
0,5	ml	$(NH_4)_2SO_4$	0,5 M
0,25	ml	Glutamat	1,0 M (neutralisiert)
0,25	ml	H_2O	
1,0	ml	ATP	0,2 M (neutralisiert)
1,25	ml	Phosphoenolpyruvat	(16 mM)
0,25	ml	Pyruvat-Kinase	(2000 U/ml)
0,25	ml	^{14}C-Glutamin	(ca. 2,5 µ Ci)

Pro Test wurden 135 µl Testmischung zu je 100 µl Homogenatüberstand pipettiert. Nach 15 min. Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl eiskaltem Imidazol-Puffer (10 mM, pH 7,3) gestoppt.
Die Elution der Dowex-Säulchen (Bettvolumen ca. 1,3 ml) wurde wie folgt durchgeführt:

Fraktion	I	735 µl	gestoppter Test
		1000 µl	Imidazol-Puffer
Fraktion	II	2000 µl	Imidazol-Puffer

(Fraktion III)	700 µl	0,5 M HCl
Fraktion IV	2000 µl	0,5 M HCl
Fraktion V	2000 µl	0,5 M HCl

Die Fraktionen I, II, IV und V wurden mit je 5 ml Szintillator (350 ml Triton X 100,650 ml Toluol, 3 g PPO und 75 mg POPOP) versetzt und im Szintillationszähler ausgezählt. Vor Verwendung wurde das käufliche ^{14}C-Glutamat unter analogen Bedingungen säulenchromatographisch gereinigt.

2.8.5.5. Bestimmung der Harnstoffzyklusenzyme

Die Aktivitäten der Harnstoffzyklusenzyme wurden analog zu den Angaben von Schimke (323) in einfachen oder gekoppelten Testsystemen über die Bildung von Citrullin oder Harnstoff bestimmt, deren Konzentrationen kolorimetrisch ermittelt wurden. Die begrenzte Menge an Probenmaterial machte jedoch einige Änderungen der für größere Homogenatmengen ausgelegten Testvorschriften nötig, die im folgenden eingehend beschrieben werden sollen.

Abweichend von der in der Literatur üblichen Definition einer Enzymeinheit für die Enzyme des Harnstoffzyklus wurde in dieser Arbeit die Standarddefinition verwendet. Allerdings wurden alle Enzyme einheitlich bei 37 °C gemessen.

2.8.5.5.1. Carbamoylphosphat Synthase

Die Aktivität dieses Enzyms wurde im gekoppelten Test über die Bildung von Citrullin bei Überschuß von Ornithin und Ornithin Transcarbamoylase bestimmt.

Nach Schimke (323) ist der Zusatz von partiell gereinigter Ornithin Transcarbamoylase wünschenswert; dies erscheint jedoch nicht zwingend, da die Ornithin Transcarbamoylase im Zellhomogenat in mindestens 10 bis 15-fachem Überschuß gegenüber der Carbamoylphosphat Synthetase vorliegt. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Zugabe von Ornithin Transcarbamoylase verzichtet, da Kontrollexperimente unter Zusatz von käuflichem

Enzym keine Hinweise auf eine Limitierung der Reaktionsgeschwindigkeit erbrachten; dies galt auch nach vorheriger Hormoninduktion. Die Bildung von Citrullin war der eingesetzten Proteinmenge bis mindestens zum 4-fachen des üblichen Quantums proportional, ebenso bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 30 min.

Zusammensetzung der Testmischung

2 Teile	140 mM NH_4HCO_3; 28 mM Ornithin; 14 mM $MgSO_4 \times 7\ H_2O$
1 Teil	28 mM N-Acetyl-Glutamat
1 Teil	28 mM ATP; 56 mM Phosphoenolpyruvat

Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Testmischung mit reinem CO_2 begast, und hernach der pH mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurden 50 µl Pyruvat-Kinase (2000 U/ml) pro ml Testmischung supplementiert.
Der Test wurde durch Zugabe von 250 µl Testmischung zu 100 µl Gesamtzellhomogenat gestartet. Nach 15 min. wurde die Reaktion mit 500 µl 18 % $HClO_4$ gestoppt. Für die Citrullinbestimmung wurden Aliquots von 700 - 800 µl verwendet.

2.8.5.5.2. Ornithin Transcarbamoylase

Die Aktivität der Ornithin Transcarbamoylase wurde direkt aus der Bildung von Citrullin bestimmt.

Zusammensetzung der Testmischung

19 Teile	63 mM Glycylglycin pH 8,0; 19 mM Ornithin
1 Teil	480 mM Carbamoylphosphat (Ansatz unmittelbar vor Testbeginn wegen Instabilität)

Zur Inkubation wurden 100 µl Gesamtzellhomogenat eingesetzt und der Test mit 600 µl Testmischung gestartet. Nach 15 min. wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 18 % $HClO_4$ gestoppt. Für die Citrullinbestimmung wurden Aliquots von 100 - 200 µl verwendet.

2.8.5.5.3. Argininosuccinat Synthetase

Unter Ausnutzung der natürlichen Reaktionssequenz des Harnstoffzyklus wurde die Aktivität der Argininosuccinat Synthetase im mehrfach gekoppelten Test über die Bildung von Harnstoff bestimmt.

Der Zusatz von Argininosuccinat Lyase erwies sich für einen linearen Reaktionsverlauf als unbedingt erforderlich; hingegen kann - auch nach Hormonstimulierung - auf den Einsatz zusätzlicher Arginase verzichtet werden.

Zusammensetzung der Testmischung:

4 Teile	122,5 mM KH_2PO_4;
	12,2 mM L-Asparaginsäure;
	7,3 mM M_8SO_4 x 7 H_2O;
	9,8 mM L-Citrullin (der pH wird nach (!)
	Auflösen des Citrullins auf 7,0 eingestellt)
2 Teile	19,6 mM ATP
	98 mM Phosphoenolpyruvat
1 Teil	Aqua dest. bzw. NaOH

Unmittelbar vor Testbeginn werden die Reagentien gemischt und der pH auf 7,8 eingestellt. Dann werden pro 1 ml Lösung je 10 µl Pyruvat-Kinase (2000 U/ml) pipettiert. Für den Test wurden 100 µl zentrifugiertes Homogenat eingesetzt. Gestartet wurde mit 250 µl Testmischung. Nach 30 min. wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 18 % $HClO_4$ beendet. Für die Bestimmung des Harnstoffs wurden 800 µl verwendet.

2.8.5.5.4. Argininosuccinat Lyase

Zur Aktivitätsbestimmung der Argininosuccinat Lyase wurde ausgenutzt, daß das in der Primärreaktion auftretende Arginin sofort durch die im Überschuß vorhandene Arginase zu Harnstoff und Ornithin hydrolysiert wird. Wie in Kontrollexperimenten gezeigt werden konnte, mußte dem Test keine zusätzliche Arginase zugesetzt werden, um die maximale Geschwindigkeit der Primärreaktion messen zu können.

Zusammensetzung der Testmischung

1 Teil 196 mM NaH_2PO_4 x H_2O pH 7,4

1 Teil 59 mM Argininosuccinat (Natriumsalz)

(Das Natriumsalz des Argininosuccinats wurde durch Ausfällen des Bariums mit Na_2SO_4 aus dem käuflichen Bariumsalz erhalten.)

Die Inkubation von 100 µl Homogenat wurde durch Zusatz von 250 µl Testmischung gestartet. Nach 40 min. wurde der Test durch 500 µl 18 %ige $HClO_4$ gestoppt. Für die Harnstoffbestimmung wurden 800 µl eingesetzt.

2.8.5.5.5. Arginase

Die Aktivität der Arginase wurde direkt über die Bildung von Harnstoff bestimmt.

Unmittelbar vor dem eigentlichen Enzymtest wurde die Arginase mit Mn^{2+}-Ionen in der von Greengard (119) angegebenen Weise aktiviert. Hierzu wurde 1 Teil Homogenat mit 1 Teil $MnSO_4$-Lösung (0,1 M, pH 6,9 mit 0,1 M Maleat) versetzt und nach dem Mischen für 5 min bei 55 °C inkubiert.

Inkubationsmedium:

Glycin Puffer 0,05 M, pH 9,5, der 0,25 M Arginin enthält. Für den Test wurden 25 µl der Präinkubationslösung und 1 ml Inkubationsmedium eingesetzt. Nach 15 min. Inkubation bei 37 °C wurde mit 1 ml 18 %iger $HClO_4$ gestoppt. Für die Harnstoffbestimmung wurden Aliquots bis 50 µl eingesetzt.

2.8.5.6. Bestimmung von Harnstoff und Citrullin

a) Methode nach Foster und Hochholzer

Die Bestimmung von Harnstoff und Citrullin wurde im allgemeinen nach der Methode von Foster und Hochholzer (102) mit Diacetylmonoxim, Antipyrin und Arsen-Pentoxyd in schwefelsaurer Lösung durchgeführt. Diese sehr sensitive Methode lieferte unterhalb einer Extinktion von 0,35 außerordentlich gut reproduzierbare Ergebnisse, zeigte jedoch im Gegensatz zur Original-

arbeit keine lineare Beziehung zwischen der Extinktion und der Konzentration von Harnstoff oder Citrullin (Abb. 6).

Übereinstimmende Ergebnisse mit allen Nachweismethoden für Harnstoff und Citrullin ergaben sich nur bei korrekter Einhaltung der folgenden Reihenfolge:

1) Pipettieren und intensiv mischen:
   800 µl Probe (Volumenergänzung mit 10 % $HClO_4$)
   5 ml Diacetylmonoximreagenz
2) Inkubation unter Lichtabschluß für 20 min. im kochenden Wasserbad (Zwischen der Zugabe des Diacetylmonoximreagenz und der Inkubation dürfen nicht mehr als 5 min. verstreichen; das Wasserbad darf beim Schütteln der Proben nicht aufhören zu sieden!)
3) Abkühlen bei 0 °C für 5 min. (dunkel halten)
4) Aufbewahren bei 20 °C unter Lichtabschluß und sofort Messen bei 460 nm

Die korrekte Durchführung wurde bei jeder Meßreihe durch mitgeführte Eichwerte überprüft.

Zur Ermittlung der Konzentrationen von Harnstoff und Citrullin aus den Eichkurven (Abb. 6) wurden diese quadratisch approximiert:

$$c = \sqrt{\frac{Ext. - r}{s}} - t \qquad [nMol/Test]$$

Für die Konstanten ergaben sich folgende Werte:

	Probevolumen µl	r	s	t
Harnstoff	100	-42,03	0,0176	48,87
	800	-17,60	0,0488	19,0
Citrullin	100	-44,0	0,0028	126
	800	-61,5	0,0038	127

b) Methode nach Ratner (298)

Diese Methode wurde zur Harnstoffbestimmung im Anschluß an den Argininosuccinat Synthetase-Test herangezogen, da sie, im

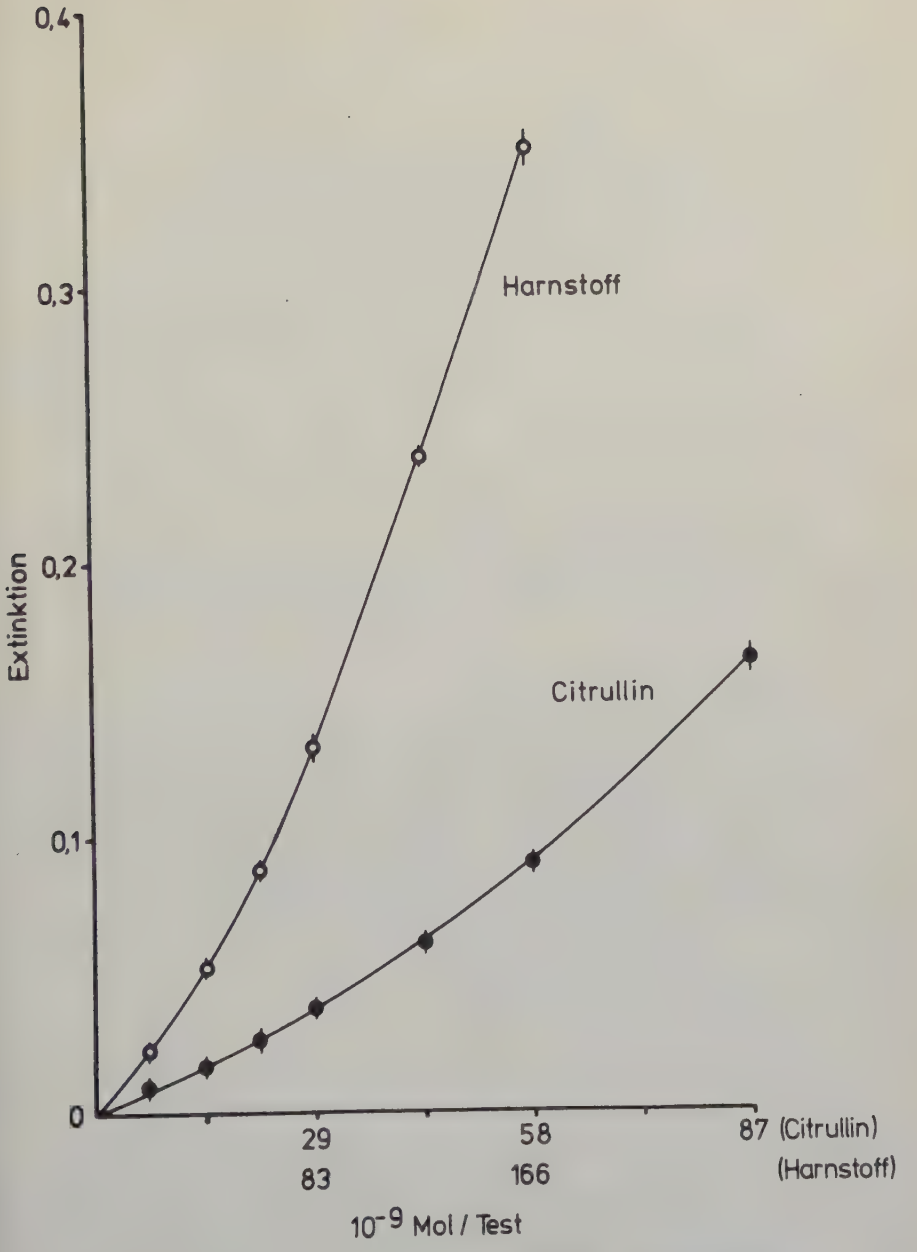


Abb. 6: Eichkurven zur kolorimetrischen Bestimmung von Harnstoff und Citrullin nach der Methode von Foster und Hochholzer (102).

Gegensatz zu der von Foster und Hochholzer (102), ziemlich unempfindlich gegen Citrullin ist.

Testansatz:

800 µl	Probelösung
5 ml	Säuremischung (90 ml konz. H_2SO_4, 270 ml konz. H_3PO_4 auf 1 l mit Aqua dest.)
250 µl	Farbreagenz (3 g α-Isonitrosopropiophenon in 100 ml Äthanol)

Nach Zugabe der einzelnen Lösungen wurde intensiv mit dem Vortex gemischt. Um den Ausschluß von Licht zu garantieren, wurden die Reagenzgläser mit Aluminiumfolie umhüllt und mit durchbohrten Gummistopfen versehen. Anschließend wurde 1 Stunde im kochenden Wasserbad inkubiert. Die Extinktion bei 540 nm wurde nach dem Abkühlen der Ansätze auf Zimmertemperatur gemessen.

Zur Standardisierung der Harnstoffbestimmung wurde eine Eichkurve mit steigenden Mengen einer 2 mM Harnstofflösung und gleichzeitig fallenden Mengen einer 2 mM Citrullinlösung angefertigt.

2.9. Darstellung der Ergebnisse

In der Regel wurden die Ergebnisse als Mittelwerte einschließlich Standardabweichungen (bei drei und mehr unabhängigen Bestimmungen) angegeben. Ist in einer Tabelle oder Abbildung keine Standardabweichung aufgeführt oder eingezeichnet, so stellen die angegebenen Werte stets Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung dar. In wenigen Fällen wurde auf eine Berechnung der Standardabweichung verzichtet und statt dessen der Bereich der Meßwerte in Klammer verzeichnet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Vergleichende Charakterisierung von Hepatozyten in Perifusion und gewöhnlicher Kultur

3.1.1. Morphologische Beobachtungen

3.1.1.1. Die Entwicklung der Hepatozytenkultur

Die Ausbildung der Hepatozyten-Monolayer aus den isolierten Zellen vollzog sich in einer charakteristischen Folge von Ereignissen, die im diskontinuierlichen Kultursystem und in der Perifusion prinzipiell ähnlich abliefen. Im folgenden wird an Hand von Beobachtungen mit dem Phasenkontrastmikroskop ein kurzer Überblick über die Entwicklung der Kultur in beiden Systemen gegeben.

Bereits kurze Zeit nach dem Einbringen der Zellsuspension in das Kulturgefäß begannen sich die mehr oder weniger homogen verteilten Zellen an das Substratum anzuheften. Dieser Vorgang, der bei einzelnen Hepatozyten erst nach einer gewissen Zeit einsetzte, war in der Regel bereits nach etwa 2 Stunden abgeschlossen. In den meisten Fällen war die Bindung an das Substratum zu diesem Zeitpunkt schon so fest, daß die Zellen bei leichtem Schwenken des Kulturgefäßes nicht mehr losgespült werden konnten. Eine schwächere Zellhaftung lag jedoch insbesondere bei kleineren Zellaggregaten vor, da diese nur teilweise mit dem Substratum in Berührung kommen. Auch in Bereichen, in denen die Zellen durch ungleichmäßige Verteilung gehäuft lagen, war die

Zellhaftung herabgesetzt und wurde auch in der Folge, der beginnenden Nekrose wegen, nicht weiter gefestigt.

Im Anschluß an das Anheften konnte bei den meisten Hepatozyten ein Ausbreiten des Zytoplasmas beobachtet werden, wodurch flachere, jedoch zunächst noch mehr oder weniger runde Zellen entstanden. Dieser Vorgang, der alle vitalen Zellen erfaßt, kann als Ausdruck einer aktiven Adaptation an die in vitro Bedingungen angesehen werden, und ist gleichzeitig Voraussetzung für eine gewisse Fortbewegung der Zellen. Im Zuge dieser Adaptation gehen die Hepatozyten - auch vollständig isoliert liegende - aus ihrer anfänglich sphärischen Gestalt in eine polygonale über, wodurch der zunächst lockere Zellverband bereits ein epitheliales Aussehen erhält. Kenntlich ist dieser Übergang im Phasenkontrastbild an einer Zunahme der Beugungserscheinungen im Randbereich der Zellen und einem stärkeren Hervortreten des Zellkerns und der Nukleoli (Abb. 7a,b). Stoßen die Hepatozyten während dieser Gestaltveränderung nicht aneinander, so ist ein begrenzter Ortswechsel möglich, der meist in Richtung auf andere Zellen hin erfolgt.

Ein erster Zell-Zell-Kontakt wird dabei offenbar über lange Filopodien hergestellt, die von einzelnen Zellen nach allen Seiten hin ausgestreckt werden.

Auf diese Weise bildeten sich nach ca. 14 Stunden in der Kultur Zellverbände, die eine ziemliche Ähnlichkeit zu den Zellbälkchen, den Trabeculi, des intakten Leberparenchyms aufwiesen und vielfältig verzweigt waren. Je nach Zelldichte entstanden zu diesem Zeitpunkt auch schon größere, untereinander verbun-

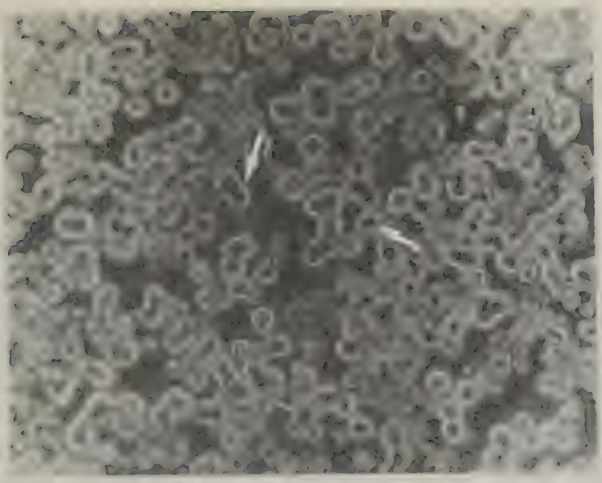


Abb. 7a

Abb. 7b

Frühe Stadien der Hepatozytenkultur
(Diskontinuierliche Kultivierung, W/AB 77-Medium)

a) Kultur nach 3,5 Stunden (Phasenkontrast, x 180)
Bei den angehefteten Hepatozyten, die begonnen haben, sich auszubreiten, zeigen sich intensive Beugungserscheinungen an den Zellrändern und helle Zellkerne (Pfeil).

b) Kultur nach 9 Stunden (Phasenkontrast, x 180)
Die Hepatozyten haben sich zu Trabeculi und kleinen Zellinseln zusammengelagert. Die intensive Lichtbeugung an den Zellrändern hat sich abgeschwächt.

dene Zellinseln. In der Folge kam es zu einem fortschreitenden Ausbreiten und Abflachen der Zellen, so daß nach 24 - 30 Stunden eine weitgehend lückenlose Zellschicht entstand, die einen ausgeprägt epithelialen Charakter besaß. Auf der Oberfläche der Monolayer fanden sich ab und zu abgestorbene Zellen mit noch kugeliger Gestalt, deren Größe bis fast auf die Hälfte reduziert war (Abb. 8).

Während des zweiten bis vierten Kulturtages veränderte sich das Erscheinungsbild der Kultur nur geringfügig. Die Hepatozyten zeigten in der Regel ein granuliertes Zytoplasma, das zur Zellperipherie hin in einen schmalen, weniger strukturierten Bereich überging. Besonders auffallend war dies an den Rändern der Zellinseln, wo sich häufig ein zerfranstes Zytoplasma mit gelegentlichen pseudopodienähnlichen Strukturen fand (Abb. 9). Nicht selten zeigten sich zwischen den einzelnen Hepatozyten große kavernenartige Bereiche, die im Phasenkontrast völlig klar erschienen (Abb. 10) und sich teilweise entlang den Zellgrenzen um die Hepatozyten herumzogen. Es war jedoch aus dem lichtmikroskopischen Bild nicht zu entscheiden, ob diese "Hohlräume" direkt zum Kulturmedium über den Zellen hin geöffnet waren. Diese Bereiche entsprechen wahrscheinlich großen, stark dilatierten Gallekanälchen (6), wie sie insbesondere in Kulturen foetaler Hepatozyten nach Behandlung mit Glucocorticoiden beschrieben wurden (34, 190, 281).

Nach dem vierten Kulturtag, im allgemeinen jedoch erst ein bis zwei Tage später, kam es bei diskontinuierlicher Kultivierung zu einer Kontraktionsbewegung an den Rändern der Zellin-

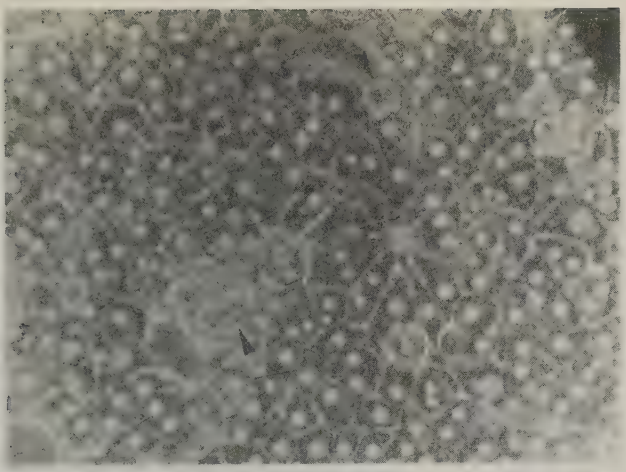


Abb. 8: Hepatozyten-Monolayer bei diskontinuierlicher Kultivierung (1 Tag alt)

Auf der Zellschicht liegen vereinzelt tote Zellen und kleine Zellklumpen (Pfeil).
(W/AB 77-Medium; Phasenkontrast, x 420)

Abb. 9: Hepatozyten-Monolayer bei diskontinuierlicher Kultivierung und reduzierter Zelldichte (2 Tage alt)

Die randständigen Zellen der Trabeculi und Zellinseln zeigen häufig ein zerfranstes Zytoplasma (Pfeil). (Zelldichte: 1,1 x 10^5 Zellen/cm^2, W/AB 77-Medium; Phasenkontrast, x 180)

seln, so daß größere, scharf begrenzte Löcher in der Monolayer entstanden (Abb. 11). In diesem Stadium ist bereits eine Zunahme der Zellnekrosen zu beobachten, die in der Folge zu einem fortschreitenden Absterben eines Großteils der Hepatozyten führt. Parallel zu diesen Veränderungen kam es gelegentlich zu einem Auswachsen von Zellen aus dem Monolayer-Verband in die Freiräume zwischen den Zellinselns, die ein ziemlich klares Zytoplasma aufwiesen und eine unregelmäßige, meist langgestreckte Gestalt besaßen (Abb. 11).

Bei Anwendung der Perifusion zeigten sich bereits wenige Stunden nach Beginn der kontinuierlichen Versorgung mit Kulturmedium deutliche Unterschiede zur diskontinuierlichen Kultur. Obwohl die Reihenfolge der Ereignisse unverändert blieb, war die Neubildung der Leberzellbälkchen schon 6 - 7 Stunden nach Aussaat der Zellen mehr oder weniger abgeschlossen. Auch die anderen Schritte der frühen Monolayer-Bildung waren gegenüber der diskontinuierlichen Kultur deutlich beschleunigt. Insbesondere galt dies für die zunehmende Ausbreitung der Hepatozyten, die zur Ausbildung der fast geschlossenen Monolayer führte. Zusätzlich war im perifundierten System die Zahl früher Zellnekrosen stark reduziert, was auch in einer höheren Absetzrate nach 24 Stunden (83 $\pm$ 2 % gegenüber 54 $\pm$ 6 % im diskontinuierlichen System) zum Ausdruck kam (vgl. 3.1.2.2.).

Während der nachfolgenden 8 Tage veränderte sich die Zellmorphologie leicht von der eher kubischen zu einer mehr unregelmäßigen und etwas langgestreckteren Form, ohne daß dadurch das epitheliale Erscheinungsbild der Zellmonolayer verloren gegan-

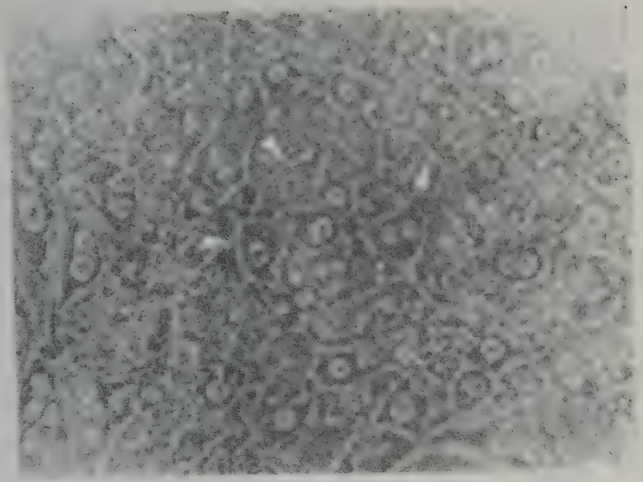


Abb. 10:

Hepatozyten-Monolayer bei diskontinuierlicher Kultivierung (4 Tage alt)

Zwischen den Zellen zeigen sich gelegentlich hell erscheinende Erweiterungen des Interzellularspalts (Pfeil); vgl. hierzu Abb. 12 und 13. (W/AB 77-Medium; Phasenkontrast, x 450)

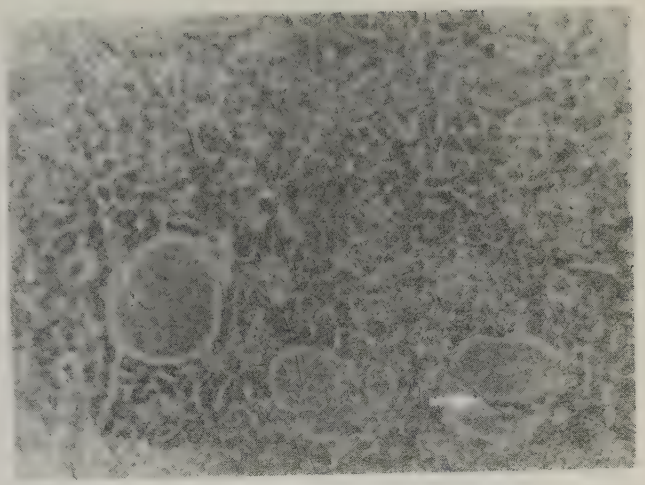


Abb. 11:

Hepatozyten-Monolayer bei diskontinuierlicher Kultivierung (5 Tage alt)

In der Zellmonolayer sind scharfrandige "Löcher" entstanden, die von fibroblastenähnlichen Zellen besiedelt werden (Pfeil). Auf der Zellschicht liegen bereits viele tote Zellen. (L-15 Medium; Phasenkontrast, x 180)

gen wäre (Abb. 12). Auffallend war ferner, daß die stark dilatierten, klaren gallekanälchenartigen Bereiche zwischen den Zellen seltener zu sehen waren als in der diskontinuierlichen Kultur. Auch die Kontraktionstendenz perifundierter Hepatozyten war gegenüber den diskontinuierlich kultivierten wesentlich verringert. Es konnten jedoch auch in der perifundierten Kultur nach dem 5. Tag - wenngleich seltener - einzelne Zellen mit nicht-epithelialem Aussehen beobachtet werden, die die wenigen freien Stellen zwischen den Monolayer-Bereichen besiedelten (Abb. 13). Deutlich erkennbar während dieser Zeit war eine sich ausweitende Granulierung der Zellen, mit der eine langsame, aber stetige Zunahme von großen Lipidtröpfchen einherging (Abb. 12) (vgl. 3.1.1.2.). Trotz dieser Veränderungen kam es jedoch zu keiner Häufung von Zellnekrosen, so daß die Hepatozyten über einen Zeitraum von mehr als 10 Tagen kultiviert werden konnten.

3.1.1.2. Einfluß spezieller Kulturbedingungen

Zu Beginn der Experimente mit dem perifundierten System wurden zunächst die Kulturbedingungen beibehalten, die bereits zuvor während meiner Diplomarbeit zur Anwendung gekommen waren (109) und die bei diskontinuierlicher Kultivierung allgemein üblich sind (35, 39, 388). Diese Bedingungen erwiesen sich bei der Perifusion als nur bedingt geeignet und führten zu verschiedenen morphologischen und biochemischen Veränderungen der Hepatozyten, die häufig sogar in frühzeitige nekrotische Stadien einmündeten. Auf der Suche nach optimaleren Kulturbedingungen

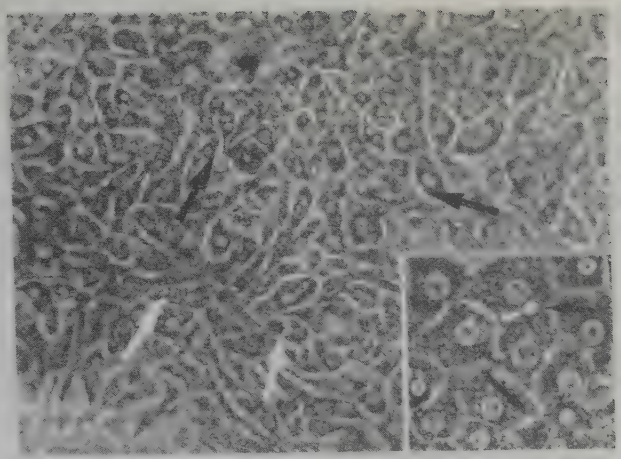


Abb. 12:

Perifundierte Hepatozytenkultur (8 Tage alt)

Der epitheliale Zellverband ist nahezu lückenlos und fast frei von toten Hepatozyten. Gelegentlich zeigen sich große Lipidtröpfchen in den kultivierten Hepatozyten (weißer Pfeil). Zwischen den Zellen sind häufig Erweiterungen des Interzellularspalts zu sehen (schwarzer Pfeil).
(Beginn der Perifusion: 20 Stunden nach Inokulation, W/AB 77-Medium (4,1 % Serum-Albumin); Phasenkontrast, x 200 , Inset: x 400)

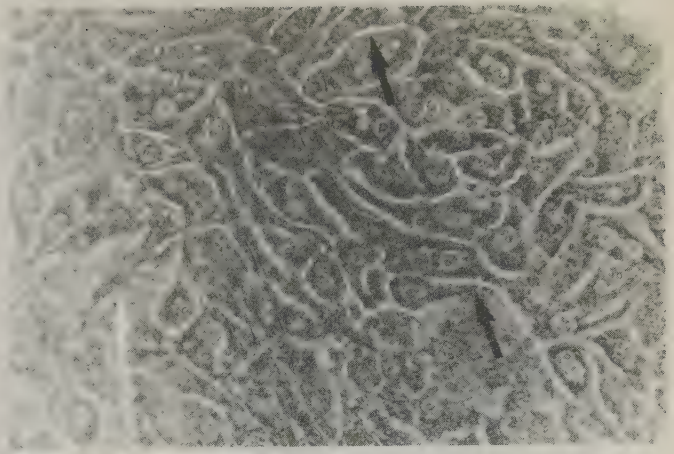


Abb. 13:

Perifundierte Hepatozytenkultur (8 Tage alt)

Die etwas länglichen Hepatozyten zeigen ein gleichmäßig granuliertes Zytoplasma und ausgeprägte Nukleoli. Beachte die Erweiterungen des Interzellularspalts (schwarzer Pfeil) und eine Zelle mit vielen zytoplasmatischen Fortsätzen (weißer Pfeil).
(Kultivierung s. Abb. 12; Phasenkontrast x 400)

für die Perifusion wurden verschiedene Variationen hinsichtlich Osmolarität, Onkotischem Druck, Sauerstoffpartialdruck, Serumzusatz, Vitaminanteil etc. geprüft, die oftmals charakteristische Folgeerscheinungen hervorriefen. Obwohl es sich hierbei um keine systematischen Untersuchungen handelte, seien die dabei gemachten Beobachtungen und Ergebnisse dennoch kurz wiedergegeben, da diese für die Kultivierung von Leberparenchymzellen von allgemeinem Interesse sein dürften.

a) Konzentration von Serum-Albumin

Bei Perifusion mit einem Kulturmedium ohne Zusatz von Serum-Albumin (über den Anteil im supplementierten Kalb-Serum hinaus) trat im Laufe der ersten drei Tage eine massive Anhäufung von "Vakuolen" in den kultivierten Hepatozyten auf (Abb. 14). Gleichzeitig stieg die Zahl der Zellnekrosen an, so daß bereits nach wenigen Tagen viele tote Zellen in den Zwischenräumen und auf der Oberfläche einer nur noch teilweise intakten Monolayer lagen. Beide Prozesse waren bei einem frühzeitigen Beginn der Perifusion (4 Stunden gegenüber 16 Stunden) deutlich beschleunigt und verstärkt. Ähnlich wirkte sich die Verwendung einer stark sauerstoffhaltigen Atmosphäre mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 (Carbogen) aus, jedoch war auch hier der Zeitpunkt des Beginns der Perifusion von großem Einfluß.

An Hand histochemischer Untersuchungen konnte zumindest ein Teil der "Vakuolen" als große Lipidtröpfchen erkannt werden. Nach Anfärbung der zuvor fixierten Zellen mit Sudanschwarz zeigten sich besonders im peripheren Bereich der Zelle runde,

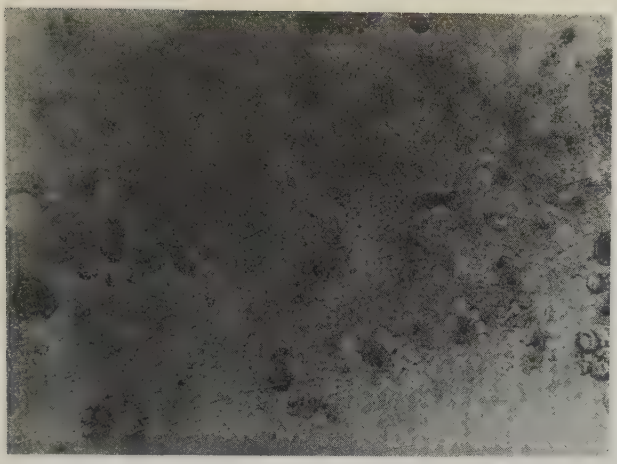


Abb. 14: Vakuoläre Auflösung des Zytoplasmas von perifundierten Hepatozyten bei suboptimalen Konzentrationen (1 %) von Serum-Albumin (3 Tage alte Kultur)

(Beginn der Perifusion: 4 Stunden, Gasatmosphäre 95 % O_2/5 % CO_2, L-15 Medium (mod.); Phasenkontrast, nach Färbung mit Eosin/Haematoxilin, x 440).

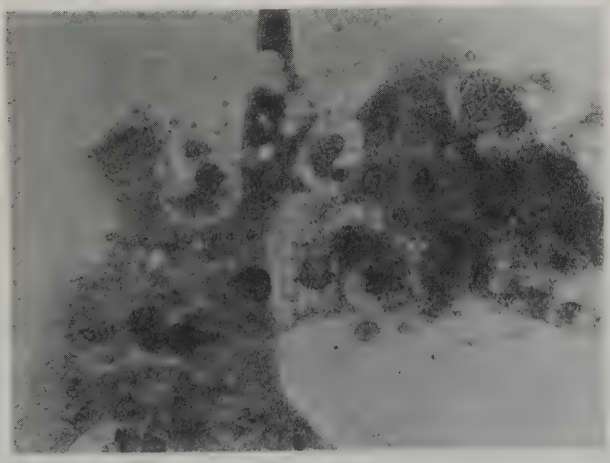


Abb. 15: Beginn der nektrotischen Degeneration perifundierter Hepatozyten bei Ersatz von Serum-Albumin durch Dextran (3 Tage alte Kultur)

(Beginn der Perifusion: 4 Stunden, Gasatmosphäre 95 % Luft/ 5 % CO_2, L-15 Medium (mod.); Phasenkontrast, x 440)

dunkel gefärbte Einschlüsse (Abb. 16). Gelegentlich waren dazwischen jedoch auch eher klar erscheinende, ebenfalls runde Strukturen zu erkennen, deren Natur nicht geklärt werden konnte. Kontrollpräparate, die vor der Färbung durch Behandlung mit Pyridin von Lipiden befreit wurden, waren vollständig entfärbt (Abb. 17). Ähnliche Resultate konnten auch mit Oil Red O anstelle von Sudanschwarz erhalten werden. In Gegenwart hoher Albuminkonzentrationen (ca. 4,1 % entsprechend dem Gehalt der Leberlymphe (107)) war die Bildung von Lipidtröpfchen stark reduziert (vgl. Abb. 12). Erst nach ungefähr 8 Tagen konnte eine langsame, aber stetige Zunahme lichtmikroskopisch sichtbarer Vakuolen beobachtet werden. Ein Ersatz des Albumins durch Dextran desselben Molekulargewichtsbereiches brachte hingegen keine Veränderung gegenüber unsupplementiertem Medium (Abb. 15). Insbesondere gilt dies für das Auftreten nekrotischer Degeneration, die mit Dextran nach 3 Tagen bereits einen Großteil der Hepatozyten erfaßt hatte.

b) Serumanteil im Kulturmedium

Verschiedene Experimente, bei denen der Anteil des Serums im Kulturmedium variiert wurde, führten zu dem Ergebnis, daß die kultivierten Zellen ein Medium mit 40 % Serum gerade noch tolerieren. Bei höheren Konzentrationen kam es in relativ kurzer Zeit zu einem Absterben der Zellen. Die Toleranz gegenüber einem hohen Serumanteil (60 %) konnte allerdings gesteigert werden, wenn Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 150 000 Dalton durch Ultrafiltration aus dem Serum entfernt

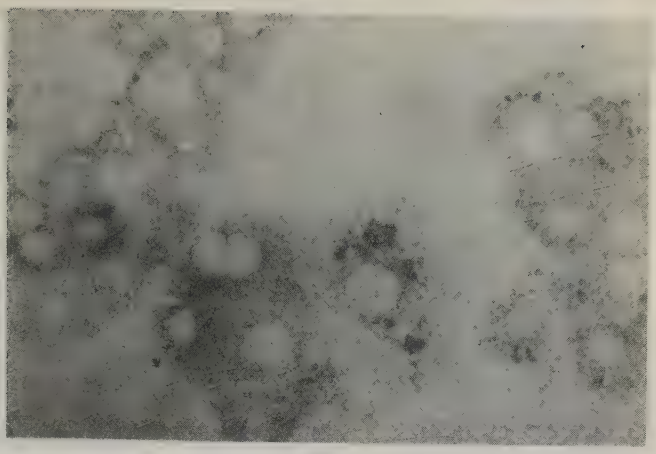


Abb. 16: Lipidakkumulation in perifundierten Hepatozyten bei suboptimalen Konzentrationen von Serum-Albumin (2 Tage alte Kultur)

Lipidfärbung mit Sudan Schwarz B
(Kultivierung s. Abb. 15; Phasenkontrast, x 500)

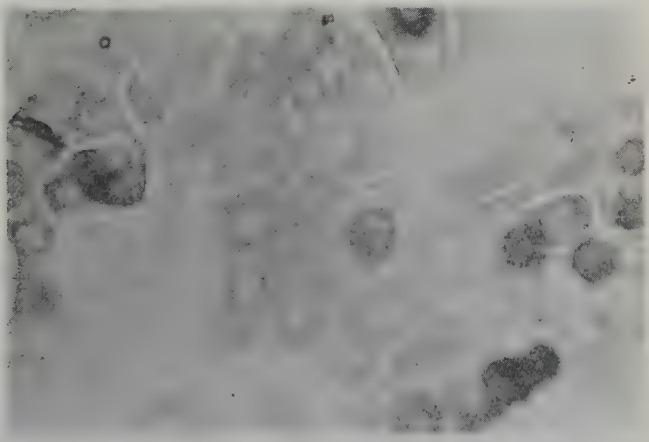


Abb. 17: Lipidakkumulation (Pyridin-behandelte Kontrollfärbung)

(Kultivierung s. Abb. 15; Phasenkontrast, x 480)

wurden. Diese Einflüsse konnten sowohl in der diskontinuierlichen Kultur, als auch in der Perifusion beobachtet werden. Ein großer Unterschied zwischen beiden Kultursystemen zeigte sich jedoch, wenn auf eine Supplementierung des Mediums mit Serum verzichtet wurde. Während in der diskontinuierlichen Kultur nur eine geringere Absetzrate bzw. ein einmaliger begrenzter Verlust an Hepatozyten beobachtet werden konnte, eine Kultivierung über mehrere Tage also durchaus erfolgreich war, gingen unter serumfreien Bedingungen in der Perifusion innerhalb von zwei Tagen fast alle Zellen zugrunde (Abb. 18). Teilweise traten hier die Nekrosen schon am ersten Tag auf. Durch Zusatz von nur 2 % Serum zum Kulturmedium wurde eine solche Entwicklung vermieden.

c) Vitaminanteile des Kulturmediums

Bei Kultivierung mit 10 % Kalb-Serum, jedoch ohne Vitaminanteile des Kulturmediums, kam es in beiden Kultursystemen zu einer "wabenartigen" Auflösung des Zytoplasmas der Hepatozyten (Abb. 19). Im diskontinuierlichen System zeigten fast alle Zellen nach 2 bis 3 Tagen eine derartig veränderte Morphologie, während in der Perifusion, je nach Menge des zirkulierenden Mediums, ein ähnliches Ausmaß erst später beobachtet wurde. Eine Kultivierung über mehr als 5 Tage war jedoch auch in der Perifusion unmöglich.

Auf den Zusatz von Pyridoxin konnte bei diskontinuierlicher Kultivierung ohne sichtbare Auswirkungen verzichtet werden. Dies war selbst dann möglich, wenn zugleich serumfreies Medium

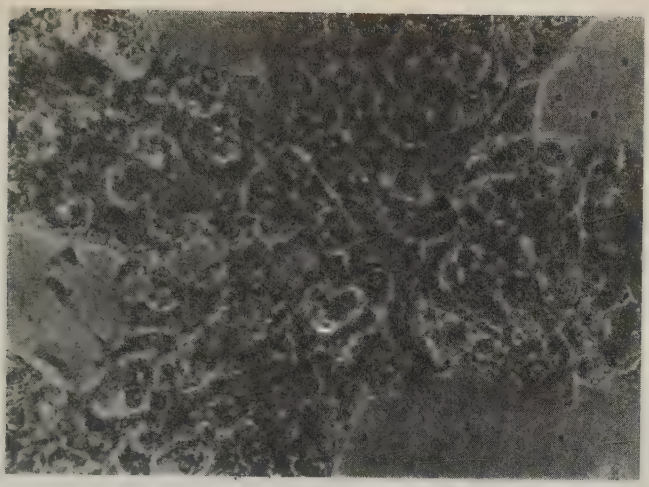


Abb. 18: Nektrotische Degeneration der Hepatozyten bei Perifusion mit serumfreiem Medium (2 Tage alte Kultur)

(Beginn der Perifusion: 20 Stunden, Gasatmosphäre 95 % Luft/ 5 % CO_2, W/AB 77-Medium; Phasenkontrast, x 400)

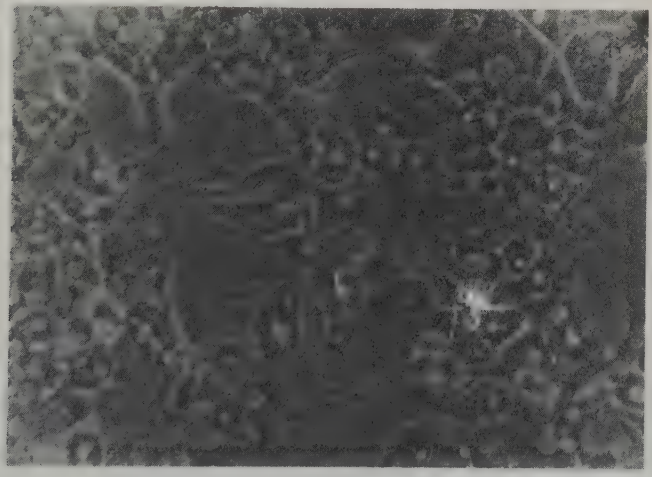


Abb. 19: Wabenartige Auflösung des Zytoplasmas diskontinuierlich kultivierter Hepatozyten in vitaminfreiem Medium (3 Tage alte Kultur)

(W/AB 77-Medium; Phasenkontrast, x 400)

oder Zellen von Ratten verwendet wurden, die zuvor 5 Wochen auf einer B_6-Mangeldiät gehalten worden waren.

3.1. Zellbiologische und biochemische Parameter

3.1.1. Einfluß des Substratums auf die Anheftung der Hepatozyten

Die Abhängigkeit von der Anheftung an ein Substratum ist eine bedeutsame Eigenschaft differenzierter, nicht transformierter Zellen (346, 376). Für den Aufbau der Perifusionskultur war es deshalb von Interesse, ein möglichst gutes Substratum auszuwählen, das zugleich einfach und steril in die Kulturkammern eingebracht werden konnte.

Da die Frage der Entnahme von Zellen aus der Kulturkammer durch die Unterteilung des Kammerbodens in verschiedene Sektoren mittels Objektträger gelöst werden sollte, lag es nahe, Glas als Trägermaterial heranzuziehen. Der Vergleich mit einer Plastikunterlage bot sich an, da einerseits Plastikpetrischalen für die diskontinuierliche Kultivierung verwendet werden und andererseits Glas für seine Zytotoxizität gegenüber verschiedenen Zellarten bekannt ist. Als Maß für die Anheftung wurde sowohl die Zellzahl (bestimmt über das Auszählen der Zellkerne (Abschn. 2.4.4.)) als auch der Proteingehalt herangezogen. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, liefern beide Parameter innerhalb von 24 Stunden übereinstimmende Ergebnisse.

Während in unbehandeltem Zustand zwischen Plastik (45 - 50 % Anheftung) und Glas (ca. 30 %) nach 4 Stunden ein sehr deutli-

Unterlage	Beschichtung	Maß für die Anheftung			
		Zellzahl (%)		Zellprotein (%)	
		4 h	24 h	4 h	24 h
Plastik	keine	46 ± 11	39 ± 6	52 ± 5	41 ± 4
	Kollagen	87 ± 5	69 ± 7	86 ± 6	71 ± 6
	Albumin (denat.)	90 ± 4	74 ± 4	-	-
Glas	keine	30 ± 9	27 ± 8	32 ± 6	29 ± 7
	Kollagen	86 ± 7	70 ± 8	85 ± 6	70 ± 3
	Albumin (denat.)	91 ± 6	87 ± 10	-	-

Tabelle 2: Einfluß des Substratums auf das Absetzen der Hepatocyten

cher Unterschied besteht, verschwindet dieser nach Beschichtung mit Kollagen beinahe völlig. Dieses Substratum steigert die Absetzrate auf ungefähr 85 % und macht die Anwesenheit von Serum im Kulturmedium weitgehend überflüssig. Ein noch besseres Substratum scheint Rinder-Serum-Albumin zu sein, das mit Glutaraldehyd vernetzt wurde. Hier konnte die Absetzrate auf 90 % angehoben werden, außerdem deuteten enzymatische Messungen darauf hin, daß bei diesem Substratum der Austritt von Zellenzymen ins umgebende Kulturmedium wesentlich verringert ist. Nachteilig wirkt sich hier der umständliche Polymerisationsprozeß, der

Aufwand zur intensiven Entfernung des überflüssigen Glutaraldehyds, sowie die Interferenz mit der Proteinbestimmung aus. Diese Gründe ließen eine Beschränkung auf die Kollagenbeschichtung angezeigt erscheinen, obwohl polymerisiertes Albumin die Möglichkeit zu weiterer Modifikation des Substratums eröffnet (214).

3.1.2.2. Zeitliche Änderung des Proteingehalts

Der Proteingehalt der kultivierten Zellen wurde als Bezugsgröße für die enzymatischen Messungen herangezogen, da er sich einfach und mit ausreichender Empfindlichkeit bestimmen läßt. Er kann, insbesondere zu Beginn der Kultivierung, als grobes Maß für die Zellzahl angesehen werden, mit zunehmender Kultivierungsdauer ergeben sich jedoch Abweichungen, da sich der zelluläre Proteingehalt in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen mehr oder weniger stark ändert.

Abb. 20 zeigt die zeitliche Änderung des Gesamtproteingehalts in einer Petrischale oder Kulturkammer bei diskontinuierlicher Kultivierung und bei Perifusion.

Bei diskontinuierlicher Kultivierung in Gegenwart von 10 % Serum fand sich eine stetige Abnahme des Gesamtproteingehalts während der ersten zwei Tage. Danach blieb er etwa bis zum 5. Tag konstant bei ungefähr der Hälfte des Ausgangswertes, um anschließend erneut abzusinken. Wurde der Serumanteil des Kulturmediums nach den ersten 4 Stunden von 10 % auf 5 % verringert, so stabilisierte sich der Gesamtproteingehalt erst bei ca. einem Drittel (des Ausgangswertes), wobei die Verlaufscharakteristik insgesamt unverändert blieb.

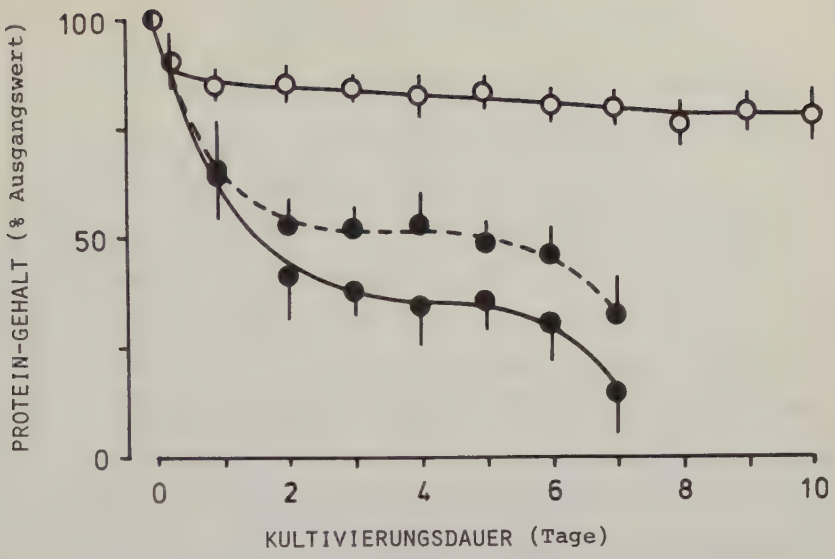


Abb. 20: Zeitliche Änderung des Gesamtproteingehalts pro Kulturgefäß bei diskontinuierlicher Kultivierung (●) und bei Perifusion (○).

Durchgezogene Linie: 10 % Serum
Unterbrochene Linie: Wechsel von 10 % auf 5 % Serum nach 4 Stunden
Anzahl der Versuche: N = 15

Im Gegensatz hierzu trat im perifundierten System die Stabilisierung des Gesamtproteingehalts bereits während der ersten Stunden nach Anschluß der Perifusion ein. Über einen Zeitraum von 9 Tagen verringerte er sich nur unwesentlich von 81 % auf 76 %. Auch bei Übergang zu 5 % Serum im Perifusionsmedium konnte keine nennenswerte Abweichung von diesem Verlauf beobachtet werden.

3.1.2.3. Zeitliche Änderung des DNS-Gehalts

Im Gegensatz zum zellulären Proteingehalt sollte der Gehalt an DNS pro Zelle weitgehend konstant sein, und ein genaueres Maß für die Zellzahl abgeben. Aus diesem Grund wurden mehrere Nachweisverfahren für DNS auf ihre Anwendbarkeit untersucht und der Versuch unternommen, die Veränderung des DNS-Gehalts pro Petrischale im Laufe der Kultivierung zu charakterisieren.

Die Gegenüberstellung der Nachweisverfahren zeigt Tabelle 3 während die Bestimmung nach Burton bei der Trennmethode nach Schmidt-Thannhauser und der nach Schneider gut übereinstimmende Werte ergab, waren die Messungen nach Ceriotti im ersten Fall zu nieder und im zweiten Fall zu hoch. Möglicherweise sind hierfür - entgegen den Beteuerungen in der Literatur - doch Einflüsse von Ribosederivaten verantwortlich. Beim Umgang mit verdünnten Zellsuspensionen stellten sich die beiden Methoden zur DNS-Extraktion, insbesondere bei kleinen Probevolumina, als zu störanfällig heraus, und die Nachweismethoden erwiesen sich als zu unempfindlich. Aus diesen Gründen mußte darauf verzichtet werden, den DNS-Gehalt der Zellen als Bezugsgröße zu verwenden. Um jedoch einen Überblick über die zeitliche Veränderung des DNS-Gehalts zu erhalten, wurde dieser - bei kombinierter Anwendung der Verfahren von Schneider und Burton - an Kulturen gemessen, die den Einsatz von 1 - 2,5 x 10^6 Zellen pro Test ermöglichten (unsegmentierte Petrischalen).

Das Ergebnis zeigt Abb. 21. In der diskontinuierlichen Kultur findet sich ein nahezu exponentieller Abfall über einen Zeitraum von 5 Tagen. Bei Verwendung von 10 % Serum sinkt der DNS-

Vorbehandlung	Farbreaktion	DNS-Gehalt			
		Homogenat		isolierte Zellen	
		mg/g Frischgew.	µg/mg Protein	µg/mg Protein	µg/10^6 Zellen
Schmidt-Thannhauser	Ceriotti	1,66 ± 0,09	8,6 ± 0,4	7,1 ± 0,1	13,7 ± 0,2
	Burton	1,79 ± 0,04	9,2 ± 0,2	7,3 ± 0,2	14,1 ± 0,4
Schneider	Ceriotti	1,99 ± 0,06	10,2 ± 0,3	7,7 ± 0,3	14,8 ± 0,5
	Burton	1,82 ± 0,03	9,4 ± 0,2	7,4 ± 0,2	14,2 ± 0,3

Tabelle 3: DNS-Gehalt von Gesamtleberhomogenat und frisch isolierten Hepatocyten - Methodenvergleich

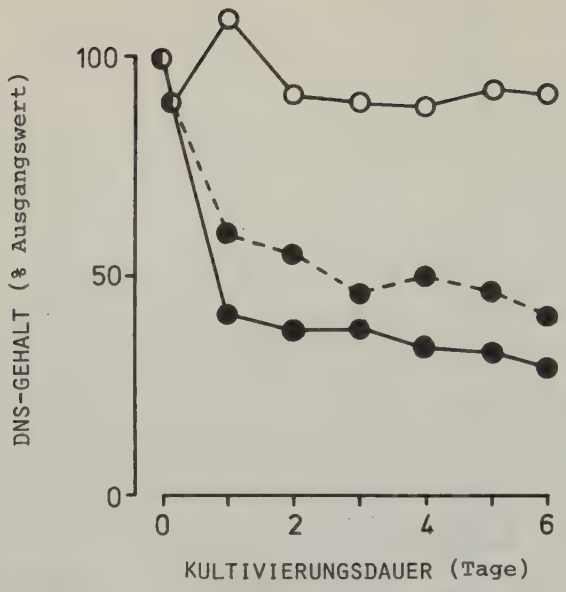


Abb. 21: Zeitliche Änderung des DNS-Gehalts pro Kulturgefäß bei diskontinuierlicher Kultivierung (●) und bei Perifusion (O)

Durchgezogene Linie: 10 % Serum
Unterbrochene Linie: Wechsel von 10 % auf 5 % Serum nach 4 Stunden

Gehalt während dieser Zeit auf etwa 55 % ab, wohingegen bei 5 % Serum nur noch ungefähr 45 % vorhanden sind.

In der Perifusion zeigt sich nur zwischen dem ersten und zweiten Kulturtag eine Abnahme unabhängig vom Serumgehalt des Kulturmediums. Im weiteren Verlauf der Perifusion bleibt der DNS-Gehalt pro Kulturkammer bei ungefähr 75 % stabil.

3.1.3. Stoffwechseleigenschaften

Zur Charakterisierung der verschiedenartig kultivierten Zellen sollte auch deren Stoffwechsel herangezogen werden. In direktem Zusammenhang mit den Untersuchungen zur hormonellen Regulation der Glutamin-Synthetase und der Harnstoffzyklusenzyme wurden hierfür Teilbereiche des Stickstoffstoffwechsels ausgewählt.

Über den Aminosäurestoffwechsel - analysiert an Hand der Veränderungen des Aminosäuremusters im Medium - sollte Aufschluß über die Stoffwechsellage der kultivierten Hepatozyten und deren Bedarf an speziellen Aminosäuren erhalten werden. Gleichzeitig vermitteln diese Messungen ein unmittelbares Bild von den Verschiebungen, die im Laufe einer Kultivierungsperiode in der Zusammensetzung des Kulturmediums eintreten.

Die Untersuchung der Harnstoffsynthese wiederum liefert ein metabolisches Pendant zu den Messungen der Harnstoffzyklusenzyme. Diese komplexe Stoffwechselleistung stellt ferner ein aussagekräftiges Vitalitätskriterium dar, da sie auf dem engen Zusammenwirken verschiedener Zellkompartimente beruht und von der Bereitstellung von Energie (ATP) und einem ausreichenden Angebot von CO_2 abhängt.

Über beide Stoffwechselbereiche ist zudem eine Aussage über die Stickstoffbilanz der kultivierten Zellen und damit über deren metabolischen Gesamtzustand möglich.

3.1.3.1. Aminosäurestoffwechsel

a) Diskontinuierliche Kultur

Infolge der geringen Menge Kulturmedium, die bei diesem System den kultivierten Hepatozyten im Laufe eines Tages zur Verfügung steht, konnten Veränderungen der Aminosäurekonzentrationen bereits innerhalb weniger Stunden leicht nachgewiesen werden. Derartige Veränderungen wurden während des zweiten Kulturtages in Kontrollkulturen und unter Einfluß von Dexamethason und Wachstumshormon oder deren Kombination gemessen, wobei serumfreies Medium verwendet wurde. Die Ergebnisse für fast alle der im Medium enthaltenen Aminosäuren sind in Abb. 22 zusammengestellt (Auf die Angabe von Ornithin (zu geringe Konzentration) und Prolin (Bestimmung zu unsicher) wurde verzichtet). Je nach Ausmaß und Richtung der Änderung lassen sich die einzelnen Aminosäuren zu Gruppen zusammenfassen:

1) Relativ konstante Konzentration: Glutamat
2) Schnelle Abnahme mit ausgeprägt exponentiellem Verlauf: Aspartat, Arginin, Glutamin und Methionin.

Abb. 22: Zeitlicher Verlauf der Aminosäurekonzentrationen im Kulturmedium bei diskontinuierlicher Kultur in Abhängigkeit von der Hormonbehandlung der Hepatozyten. Kontrolle (●, ■), Dexamethason 2 x 10^{-6} M (○), Human-Wachstumshormon 4 µg/ml (△), Dexamethason und Human-Wachstumshormon (⊙). Der schraffierte Bereich gibt die maximale Abweichung der Meßwerte in den Fällen an, in denen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen (Hormon-)Behandlungen zu erkennen waren.
(Dargestellt sind Änderungen während des 2. Kulturtages)

Abb. 32 (Text s. S. 92)

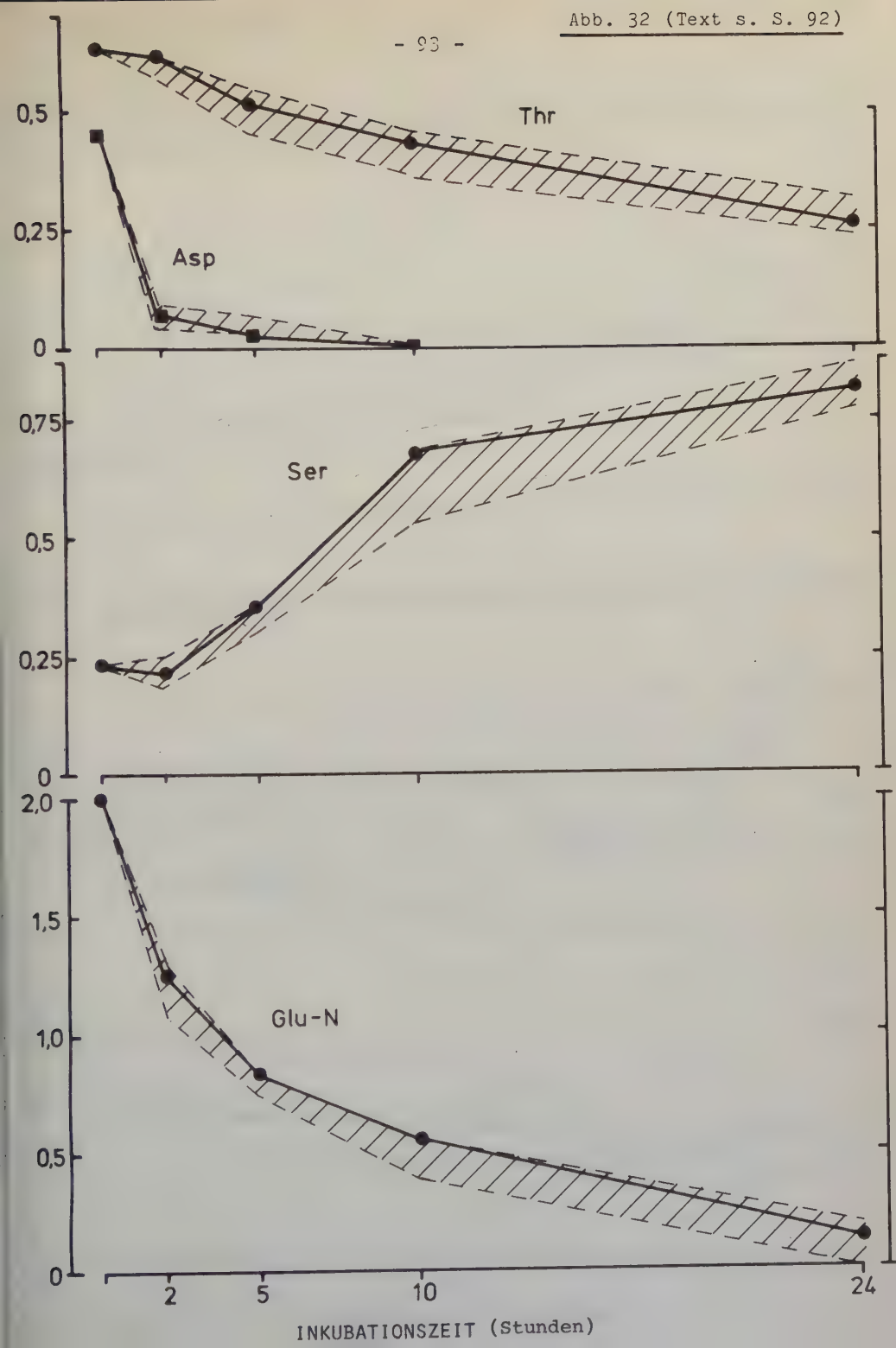


Abb. 32 (Fortsetzung)

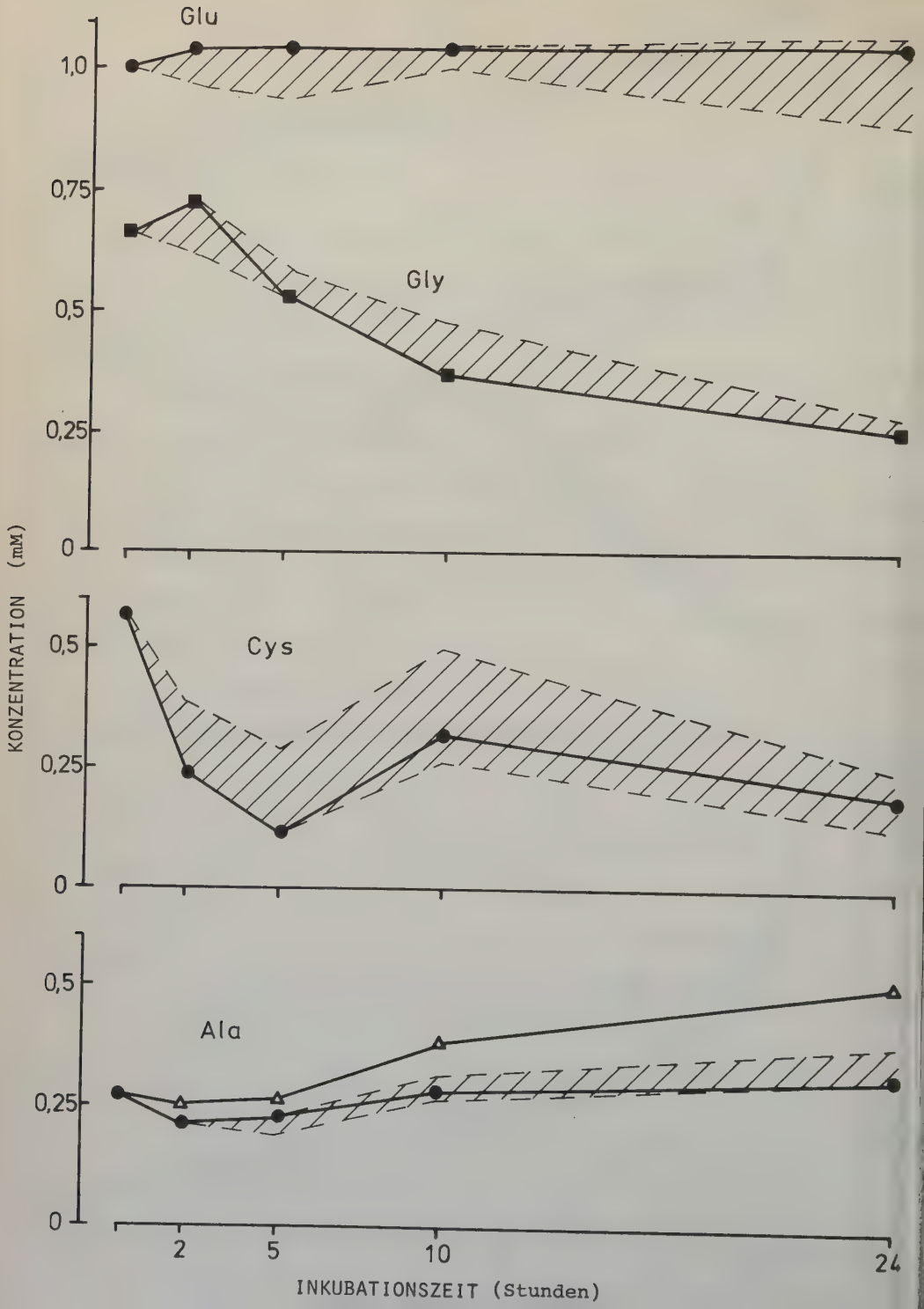


Abb. 32 (Fortsetzung)

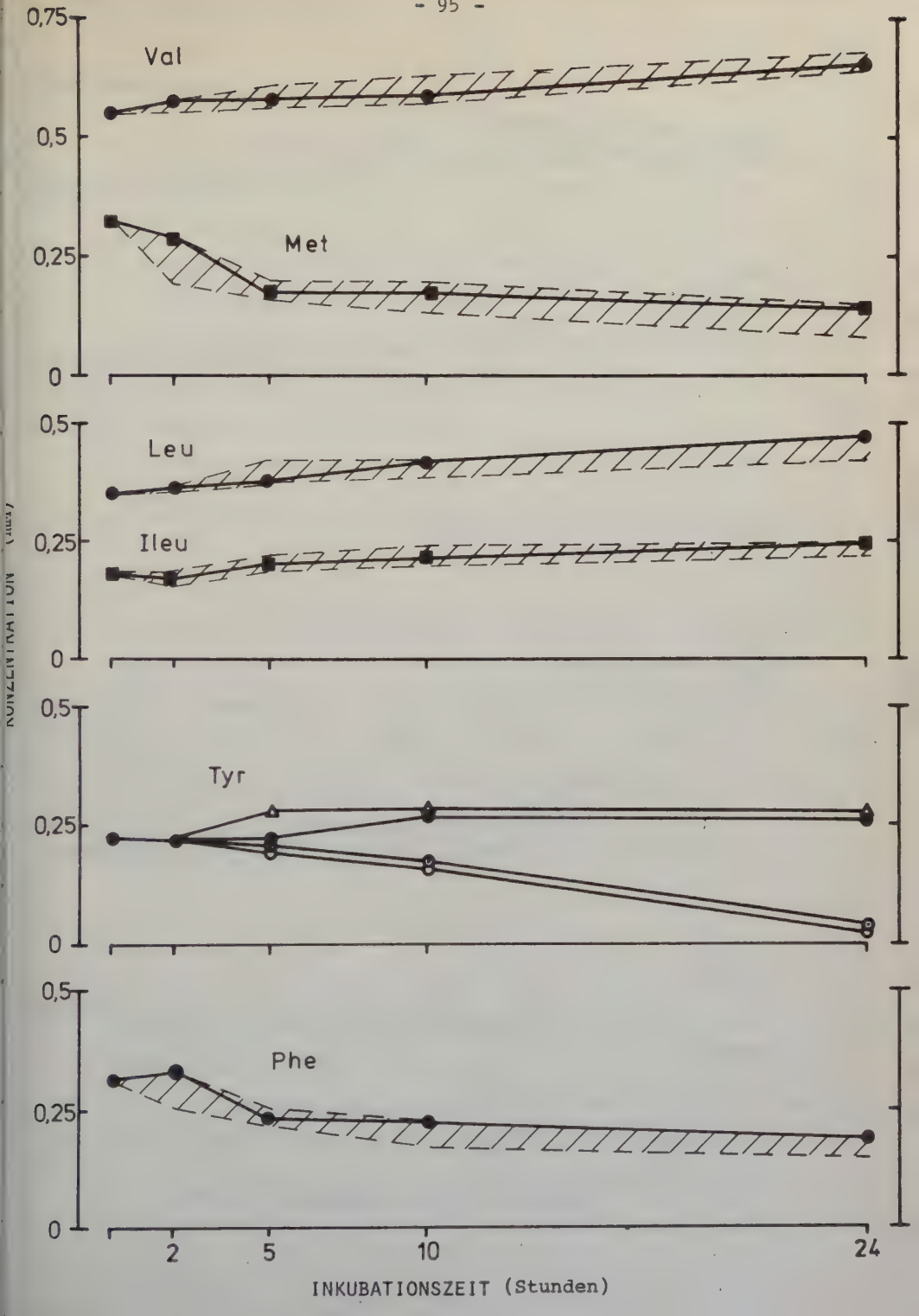
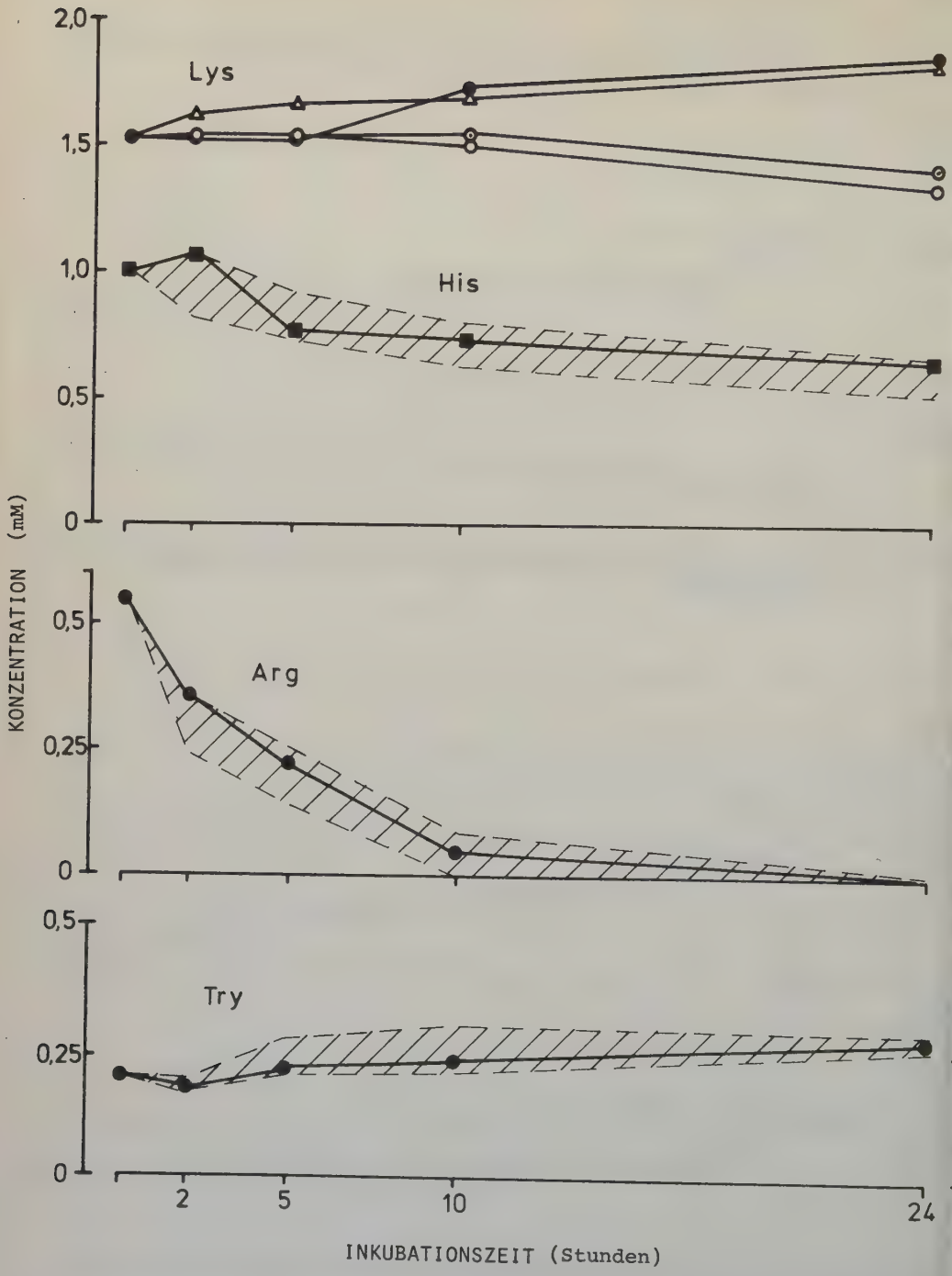


Abb. 32 (Fortsetzung)



3) Langsame Abnahme: Glycin, Histidin, Phenylalanin, Prolin und Threonin

4) Rascher Anstieg: Serin

5) Langsamer und stetiger Anstieg: Isoleucin, Leucin, Lysin, Tryptophan, Tyrosin und Valin

6) Mehrphasige Änderung: Alanin (Anstieg nach vorübergehender Abnahme), Cystein (Abnahme, die vorübergehend durch einen Anstieg unterbrochen wird)

Von den Aminosäuren in Gruppe 2 wurden Aspartat (in 10 Stunden) und Arginin (in 24 Stunden) vollständig metabolisiert, während Glutamin zu ca. 93 % und Methionin zu etwa 55 % umgesetzt wurden.

In Gegenwart von Dexamethason trat eine sehr auffällige Änderung bei Tyrosin ein, das nunmehr innerhalb von 24 Stunden fast vollständig metabolisiert wurde. Eine deutliche Änderung konnte auch bei Lysin gemessen werden, wo an Stelle eines Anstiegs eine geringfügige Abnahme der Konzentration trat. Schwächere Einflüsse des Hormons können auch bei Alanin und eventuell Cystein vermutet werden. Bei den übrigen Aminosäuren lassen sich aus dem vorliegenden Datenmaterial keine signifikanten Differenzen erkennen.

Wachstumshormon führte weder allein noch in Kombination mit Dexamethason zu anhaltenden Abweichungen von den vorgenannten Metabolisierungsmustern. Einzige Ausnahme war Alanin, dessen Konzentrationsanstieg unter Einfluß von Wachstumshormon deutlich gesteigert ist.

Bei Supplementation des Mediums mit 5 % Serum ergaben sich

nur geringfügige Änderungen der Metabolisierungsmuster mit und ohne Hormoneinfluß.

Ein Vergleich der Aufnahme bzw. Abgabe von Aminosäuren durch die kultivierten Zellen am ersten und zweiten Kulturtag nach jeweils 24-stündiger Inkubation in Gegenwart von 5 % Serum und Dexamethason ist in Abb. 23 dargestellt. Als wichtigstes Ergebnis kann festgehalten werden, daß der Unterschied im wesentlichen nur quantitativer Natur ist; eine qualitative Änderung war nur bei Tryptophan zu beobachten, dessen Konzentration am ersten Tag ab-, am zweiten jedoch zunahm.

Offensichtlich weisen die kultivierten Hepatozyten an beiden Tagen einen sehr ähnlichen Aminosäurestoffwechsel auf, der höchstwahrscheinlich durch die Zusammensetzung des Mediums und die hormonellen Einflüsse bedingt wird.

b) Perifusion

Bei der Perifusion ergaben sich insofern Schwierigkeiten, als

---

Abb. 23: Vergleich der Aufnahme bzw. Abgabe von Aminosäuren durch Hepatozyten bei diskontinuierlicher Kultivierung und bei Perifusion.

Diskontinuierliche Kultivierung: 1. Tag (24h) (▨)
2. Tag (24h) (□)
Perifusion: 0. - 7. Tag (168h) (■)
(Abweichende Kulturbedingungen s. Text 3.1.3.1.b)
Aufgetragen ist die Differenz zwischen den Konzentrationen der Aminosäuren im frischen Medium und im "verbrauchten" Medium nach Ablauf des Versuchs.

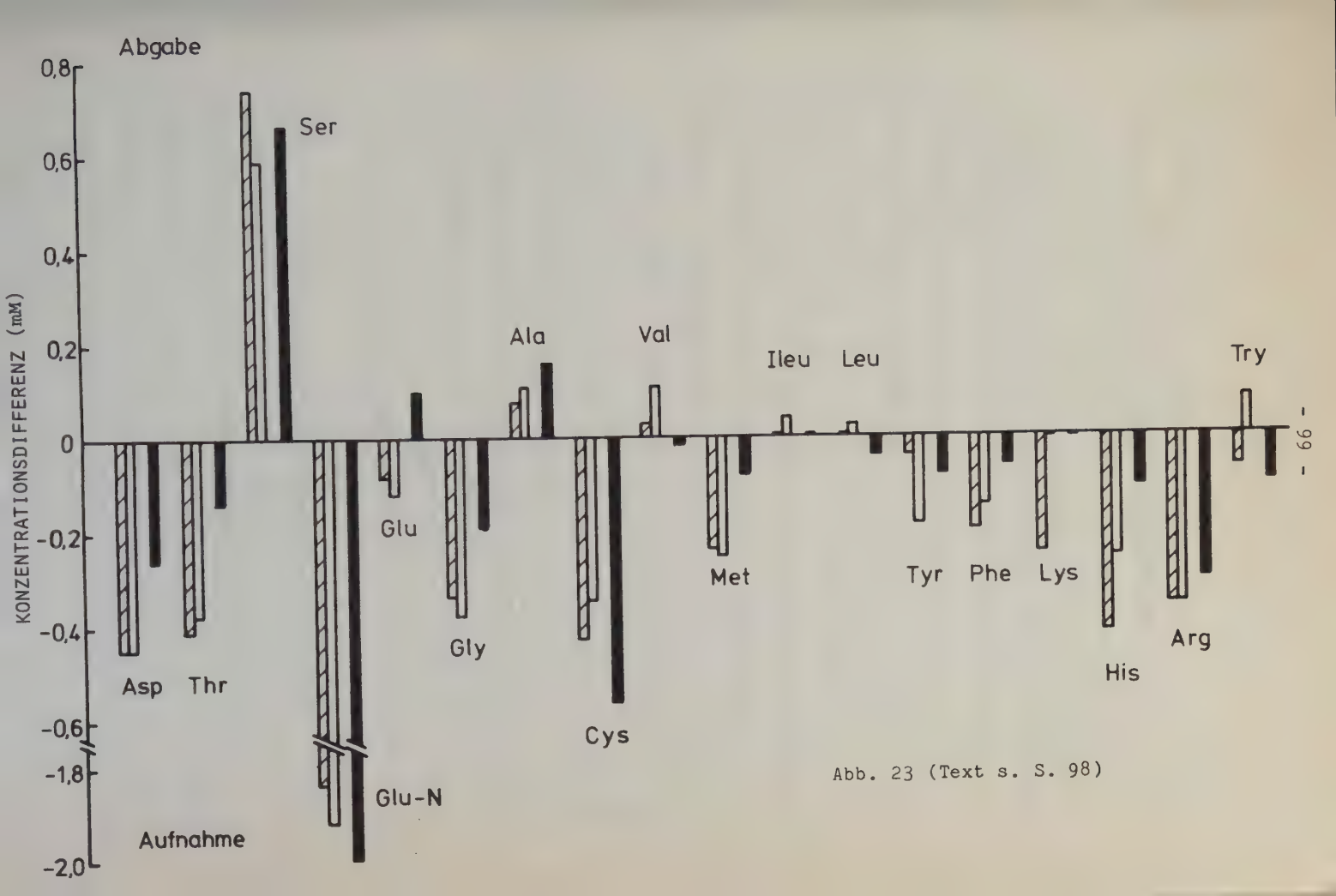


Abb. 23 (Text s. S. 98)

unter normalen Kulturbedingungen während einer Inkubation von 24 Stunden keine exakt meßbaren Differenzen bei den Aminosäurekonzentrationen auftraten. Es wurde daher eine Perifusion durchgeführt, die - entgegen dem Grundprinzip einer möglichst großen Konstanz der Kulturbedingungen - nach einer gewissen Zeit das Auftreten größerer Konzentrationsdifferenzen begünstigte. Hierzu wurde pro Kammer nur ein Gesamtvolumen von 250 ml Medium (mit 10^{-6}M Dexamethason) bereitgestellt und die Perifusion ohne Wechsel des Mediums über 7 Tage fortgesetzt. Die erhaltenen Differenzwerte für die einzelnen Aminosäuren sind in Abb. 23 eingetragen. Es fällt auf, daß nur bei wenigen Aminosäuren ein qualitativer Unterschied zur diskontinuierlichen Kultivierung auftritt. Als zusätzliche Aminosäure wird anscheinend Glutamat in geringer Menge an das Kulturmedium abgegeben. Ein wichtiger Unterschied zeigt sich auch bei Valin und Leucin, die in der Perifusion in geringem Maße aufgenommen (d.h. metabolisiert) und nicht etwa abgegeben werden wie bei diskontinuierlicher Kultivierung. Im übrigen beherrschen vor allem quantitative Unterschiede das Bild, wobei erwähnenswert ist, daß auch nach so langer Kultivierung nur Glutamin und Cystein vollständig metabolisiert wurden, nicht jedoch Aspartat und Arginin.

Wurde die Perifusion ohne Dexamethason durchgeführt, so traten Unterschiede nur bei Alanin, Methionin und Tryptophan auf; diese Aminosäuren wurden weniger abgegeben bzw. weniger aufgenommen.

3.1.3.2. Harnstoffsynthese unter normalem und erhöhtem Stickstoffangebot

Um einen echten Vergleich der Synthesekapazität der kultivierten Zellen für Harnstoff aus Substraten des Kulturmediums an beiden Kultursystemen zu erhalten, sollte die Syntheserate unter möglichst identischen Bedingungen gemessen werden. Dies machte verschiedene Abweichungen vom allgemeinen Ablauf der Perifusion erforderlich, die in Abschnitt 2.6.3.5. des Methodenteils beschrieben sind.

Die Harnstoffsynthese, gemessen an Petrischalen und Kulturkammern während der ersten vier Stunden, ergab gut übereinstimmende Werte, die einer mittleren Syntheserate von 0,16 µMol x h^{-1} x mg $Protein^{-1}$ entsprechen. Damit unterscheidet sich die Syntheseleistung nur wenig von der frisch isolierter Hepatozyten, die unter ähnlichem Substratangebot in Suspension gehalten wurden (116, 142, 237).

Die Syntheseraten zu einigen ausgewählten Zeitpunkten im Laufe längerfristiger Kultivierungsperioden sind in Abb. 24 verglichen. Zusammen mit einigen intermediär durchgeführten Messungen läßt sich folgender Verlauf skizzieren:
Im diskontiuierlichen System steigt die Syntheserate bei Verwendung von normalem Kulturmedium bis zum 2. Tag auf 0,22 $\pm$ 0,8 µMol x h^{-1} x mg $Protein^{-1}$ an.

Bereits während des 3. Kulturtages nimmt sie wieder ab und beträgt am 5. Tag weniger als die Hälfte. Bei Kultivierung in Gegenwart von 10 % TPB konnte am 2. Tag eine geringe Steigerung verzeichnet werden, die jedoch am 5. Tag wieder abgeklun-

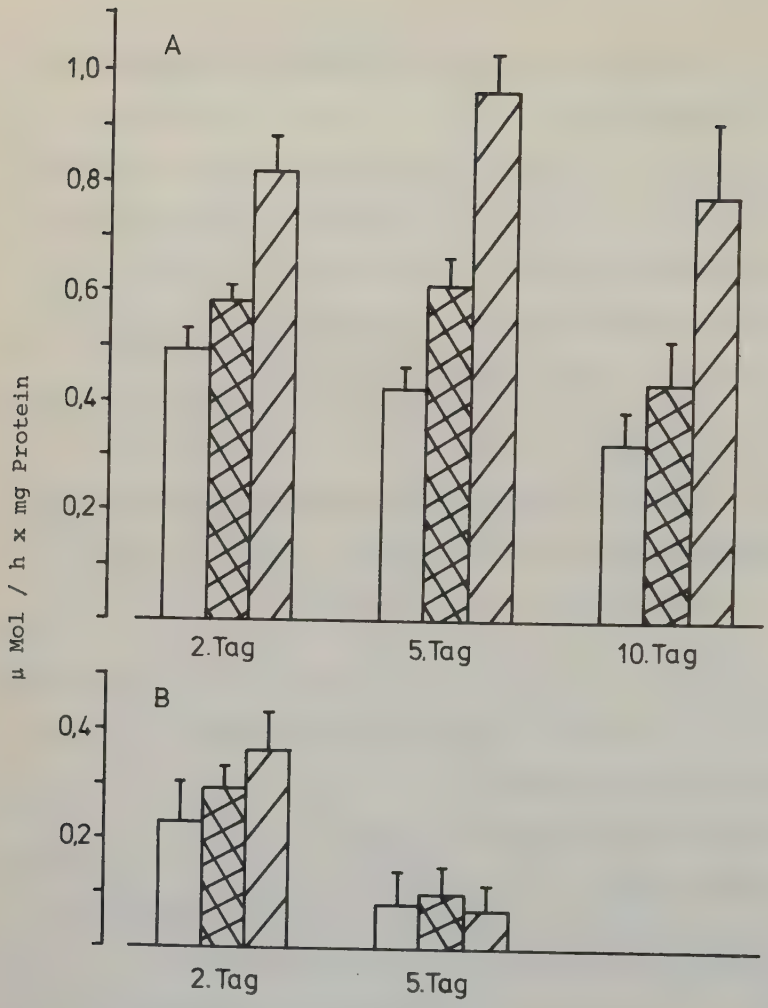


Abb. 24: Harnstoff-Syntheseraten von perifundierten (A) und diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten (B) in Kulturmedien mit unterschiedlichem Stickstoffgehalt

L-15 Medium (□), L-15 Medium mit 10 % TPB (stets anwesend) (▨), L-15 Medium mit 4 mM NH_4Cl (anwesend nur während der Meßperiode) (▨).
(Anzahl der Versuche: N = 3).

gen war. Ein ähnliches Verhalten wurde gefunden, wenn die Syntheserate in Anwesenheit von 4 mM NH_4Cl gemessen wurde. Hier betrug die Steigerung am 2. Tag immerhin 73 %.

In der Perifusion lag die Syntheseleistung zu allen Zeitpunkten wesentlich höher. Bereits nach 20 Stunden betrug die Syntheserate im Normalmedium 0,52 µMol x h^{-1} x mg $Protein^{-1}$ und lag damit um das Dreifache über der von diskontinuierlich kultivierten Zellen zum gleichen Zeitpunkt. Dieser Wert stabilisierte sich über den 2. Tag hinaus und nahm anschließend bis zum 10. Tag nur bis auf 0,31 $\pm$ 0.07 µMol x h^{-1} x mg $Protein^{-1}$ ab. Der Zusatz von 10 % TPB zum Kulturmedium steigerte die Syntheserate zusätzlich um Werte zwischen 20 % und 45 %. In Gegenwart von 4 mM NH_4Cl stieg die Syntheserate stark an und erreichte Werte zwischen 0,8 und 0,9 µMol x h^{-1} x mg $Protein^{-1}$. Durch eine weitere Erhöhung der NH_4Cl-Konzentration konnte keine Steigerung der Syntheseleistung mehr erzielt werden. Bemerkenswert ist ferner, daß bei perifundierten Hepatozyten diese maximale Synthesekapazität (in Kulturmedium) für Harnstoff für die Dauer von 10 Tagen erhalten bleibt.

Leucin (5 mM) verringerte die Menge an gebildetem Harnstoff um ca. 60 % innerhalb von 24 Stunden. Auch dieser hemmende Einfluß von Leucin war bei perifundierten Hepatozyten sehr stabil, während er bei diskontinuierlicher Kultivierung vom dritten Kulturtag an stark abnahm.

3.1.3.3. Einfluß der extrazellulären Albuminkonzentration auf die Harnstoffsynthese

In Abschnitt 3.1.1.2. der morphologischen Beschreibung war auf die Notwendigkeit hingewiesen worden, die Albuminkonzentration im perifundierten System den Werten der Leberlymphe anzupassen, um eine außerordentlich hohe Akkumulation von Lipiden in den Zellen zu verhindern. Die Auswirkung derartiger Veränderungen auf den Stickstoffstoffwechsel sollten an Hand eines Vergleichs der Harnstoffsynthese bei niederen und optimalen extrazellulären Albuminkonzentrationen deutlich gemacht werden.

Tabelle 4 zeigt die Gesamtsynthese von Harnstoff in beiden Kultursystemen am 2. und 4. Tag. Während bei diskontinuierlich

Zeit	Albumin-konzentration (%)	Harnstoffsynthese (µMol/mg Protein)	
		Perifusion	Diskontinuierliche Kultur
2. Tag	1,5	8,0 ± 0,3	4,6 ± 0,6
	4,1	13,3 ± 0,5	5,2 ± 0,4
4. Tag	1,5	2,3 ± 0,7	1,9 ± 0,5
	4,1	10,1 ± 1,1	2,1 ± 0,4

Tabelle 4: Abhängigkeit der Harnstoffsynthese von der extrazellulären Albuminkonzentration.

Inkubationsdauer: 24 h
(Anzahl der Versuche: N = 3)

kultivierten Hepatozyten kein nennenswerter Einfluß zu beobachten war, ging bei perifundierten Zellen die Syntheseleistung drastisch zurück, wenn über 4 Tage bei suboptimalen Albuminkonzentrationen perifundiert wurde.

3.1.3.4. Stimulation der Harnstoffsynthese durch Glucagon

Glucagon steigert die Harnstoffsynthese sowohl im Ganztier (215), als auch in der Leber *in vitro* (219, 349). Der Einfluß dieses Hormons auf die Harnstoffproduktion bei kultivierten Hepatozyten ist in Abb. 25 dargestellt. Im diskontinuierlichen System zeigt sich ein klarer Effekt (Steigerung um 80 %) nur am 2. Kulturtag. Ähnlich wie die basale Harnstoffproduktion weist auch die glucagonstimulierte einen nichtlinearen Verlauf über die ersten zehn Stunden auf. Am 4. Kulturtag, an dem die Harnstoffsynthese wesentlich verlangsamt ist, hat auch Glucagon nur noch eine geringe Wirkung.

Im Gegensatz hierzu steht die sehr ausgeprägte Hormonwirkung am perifundierten System, die über mehrere Tage stabil bleibt. Die Harnstoffsynthese, die über lange Zeit linear verläuft, wird auf das Doppelte und mehr (d.h. ca. 10 µMol x h^{-1} x mg $Protein^{-1}$) angehoben. Hierbei tritt offenbar keine lag-Phase auf.

Da Zusatz von NH_4Cl zum Kulturmedium die Harnstoffsynthese beträchtlich ansteigen läßt (s. Abschn. 3.1.3.1.), und diese bei einer NH_4Cl-Konzentration von 4 mM anscheinend maximal abläuft, wurde der Einfluß von Glucagon auch unter diesen Bedingungen untersucht. Der Versuch wurde am 4. Tag durchgeführt,

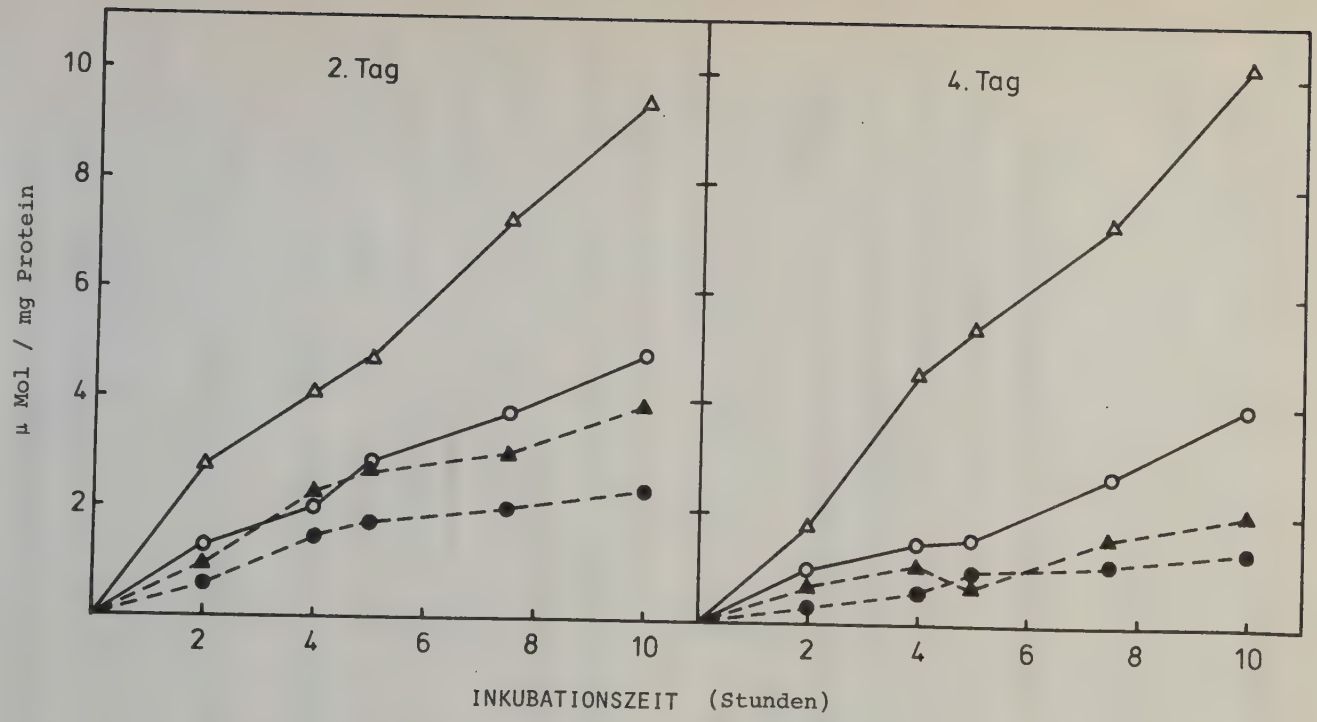


Abb. 25: Einfluß von Glucagon auf die Harnstoffsynthese von diskontinuierlich kultivierten (geschlossene Symbole) und perifundierten Hepatozyten (offene Symbole).
Kontrolle (○, ●), Glucagon 10^{-6} M (△,▲).
Kulturmedium: L-15

und die Harnstoffbildung nach einer 24-stündigen Inkubation gemessen (Tabelle 5).

Innerhalb dieses Zeitraums führte Glucagon sogar zu einer dreifach höheren Anhäufung von Harnstoff; NH_4Cl zu einem Anstieg auf den doppelten Wert (Perifusion). Wurden NH_4Cl und Glucagon gleichzeitig zugesetzt, so erfolgte eine weitere Steigerung, die mehr als additiv ist. Offenbar führt Glucagon zu einer beträchtlichen Kapazitätsausweitung für die Harnstoffsynthese. Dies wird zusätzlich verdeutlicht durch den Effekt einer Vorinkubation der Hepatozyten mit Glucagon für 24 Stunden. Diese Behandlung ließ die Harnstoffbildung aus normalem Kulturmedium ungefähr 2,5-fach ansteigen (Tabelle 5). Somit beruht zumindest ein Teil der Glucagonwirkung auf einer Konditionierung der kultivierten Zellen, die über die Anwesenheit des Hormons hinaus Bestand hat.

An diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten, wo Glucagon und NH_4Cl zusammen ebenfalls eine Steigerung (wenn auch wesentlich kleiner) bewirken, ist nur eine schwache Langzeitwirkung nachweisbar.

3.1.3.5. Stickstoffbilanz

In Anlehnung an John und Miller (156) wurde eine Stickstoffbilanz für die kultivierten Zellen aus der Netto-Aufnahme von Aminosäuren abzüglich der Bildung von Harnstoff errechnet.

Die Netto-Aufnahme von Stickstoff wurde unter Berücksichtigung des verschiedenen Stickstoffgehalts der einzelnen Aminosäuren aus den Differenzwerten von Abb. 23 bzw. gleichartiger

Behandlung	Harnstoffsynthese (µMol/mg Protein)	
	Perifusion	Diskontinuierliche Kultur
Keine	7,7 ± 0,3	2,5 ± 0,2
Glucagon	23,2 ± 0,9	2,8 ± 0,1
NH_4Cl	15,6 ± 1,2	3,8 ± 0,3
Glucagon + NH_4Cl	34,9 ± 1,7	4,5 ± 0,3
Keine (Vorbehandlung mit Glucagon für 24 Stunden)	20,3 ± 1,7	3,2 ± 0,4

Tabelle 5: Einfluß von Glucagon auf die basale und stimulierte (NH_4Cl) Harnstoffsynthese in perifundierten und diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten.

Konzentrationen: Glucagon 10^{-7} M, NH_4Cl 4 mM
Expositionszeit: 24 h

Versuche berechnet. Alle wichtigen Parameter dieser Versuche sind in Tabelle 6 eingetragen.

Bei der Perifusion war es nicht möglich (s. Abschn. 3.1.3.1.b), die Stickstoffbilanz während eines vergleichbaren Zeitraums zu bestimmen. Deshalb wurde hier die Bilanz analog über ein Intervall von 7 Tagen ermittelt und auf den Tagesdurchschnitt umgerechnet. Der Versuch ist wiederum mit dem aus Abb. 23 identisch.

Ohne den quantitativen Resultaten (auf Grund der großen Fehlerbreite) allzuviel Gewicht beizumessen, kann Tabelle 6 entnommen werden, daß in der diskontinuierlichen Kontrollkultur eine Tendenz zu einer negativen Stickstoffbilanz besteht. Unter dem Einfluß von Dexamethason stellte sich jedoch eine positive Stickstoffbilanz ein, die im wesentlichen durch eine erhöhte Aufnahme von Aminosäuren zustande kam.

Eine positive Stickstoffbilanz fand sich auch in der Perifusion trotz einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen und relativ ungünstigen experimentellen Bedingungen. Es kann somit angenommen werden, daß in der normal durchgeführten Perifusion über lange Zeit eine sehr günstige Stickstoffbilanz aufrechterhalten wird.

3.1.4. Aktivitäten verschiedener Enzyme des Stickstoffstoffwechsels

Mit der vergleichenden Untersuchung von Veränderungen des Enzymmusters wurde die Charakterisierung der perifundierten und diskontinuierlich kultivierten Hepatocyten abgeschlossen.

Kultursystem	Hormon	Medium-Volumen (ml)	Zellprotein (mg)	Nettoaufnahme an Aminosäuren 1)	Harnstoff-Konzentration 2)	Stickstoffbilanz 3)
Diskontinuierl. Kultur						
1. Tag	ohne	1,5	1,6	7,8	3,9 ± 0,1	0
	Dexamethason	"	1,5	8,8	4,1 ± 0,3	+ 0,6
2. Tag	ohne	"	1,4	5,8	3,3 ± 0,2	- 0,9
	Dexamethason	"	1,7	7,7	3.6 ± 0,2	+ 0,4
Perifusion	ohne	250,0	18,3	5,8	2,8 ± 0,1	+ 0,4
	Dexamethason	250,0	19,1	6,7	3,2 ± 0,1	+ 0,6

Tabelle 6: Vergleich der Stickstoffbilanz von Hepatozyten bei diskontinuierlicher Kultivierung und bei Perifusion.

1) µAtome Stickstoff/ml
2) mM
3) µAtome Stickstoff/mg Protein
4) Tagesmittel (7Tage)

Diese Messungen dienten gleichzeitig als Grundlage für die Studien der hormonellen Regulation der Glutamin-Synthetase und der Enzyme des Harnstoffzyklus.

Darüber hinaus wurden die Aktivitätsänderungen einiger wichtiger Transaminasen verfolgt, von denen besonders die Tyrosin-Aminotransferase, deren Beeinflussung durch verschiedene Hormone bereits gut untersucht ist, zu Vergleichszwecken herangezogen wurde.

3.1.4.1. Enzyme des Harnstoffzyklus

Vergleichende Messungen der Enzymspiegel der Harnstoffzyklusenzyme wurden während eines Kultivierungszeitraumes von 4 Tagen unter Verwendung von W/AB-77-Medium durchgeführt (Abb. 26). Unter diesen Kulturbedingungen blieben die Aktivitäten in perifundierten Hepatozyten nahezu konstant, nur bei der Argininosuccinat Synthetase und bei der Arginase trat nach dem dritten Tag in Kultur ein größerer Aktivitätsverlust auf. In diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten dagegen setzten die Aktivitätsabnahmen schon zu Beginn der Kultivierung ein und stabilisierten sich nur bei der Argininosuccinat Synthetase und -Lyase auf einem Niveau von ca. 40 % des Ausgangswerts. Bei diesen zwei Enzymen vollzog sich der Übergang zu einem neuen 'Steady State' bereits während des ersten Kulturtages.

Der Einfluß des Kulturmediums, insbesondere bei Langzeit-Kultivierung in der Perifusion ist für die mitochondrialen Enzyme und die Arginase in Tabelle 7 zusammengestellt. Hier zeigt sich, daß in perifundierten Kulturen, besonders bei Ver-

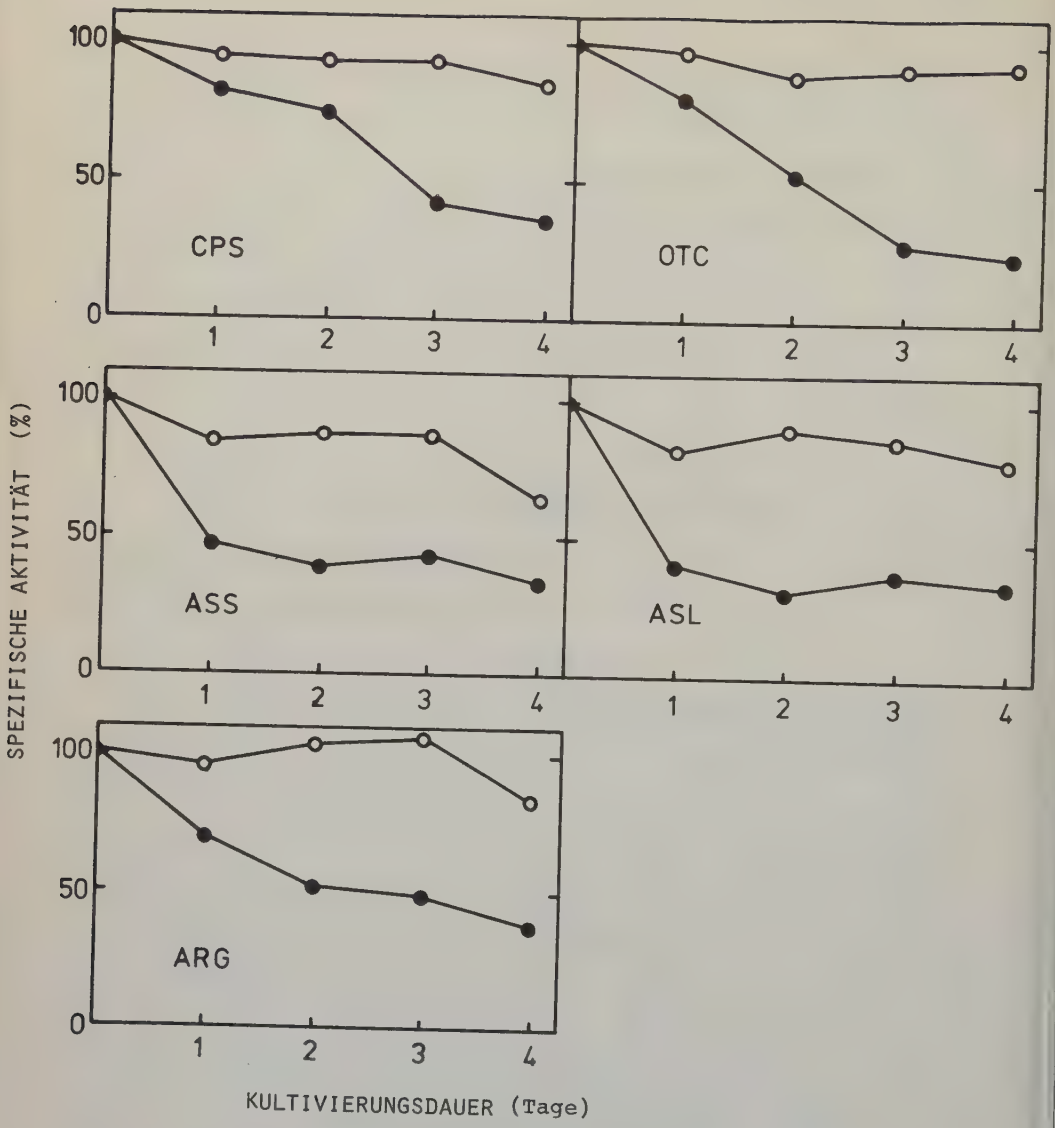


Abb. 26: Zeitlicher Verlauf der Aktivitäten der Harnstoffzyklusenzyme in perifundierten (O) und diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten (●).

Enzyme	frisch isolierte Hepatozyten	Medium	diskontinuierliches Kultursystem	perifundiertes Kultursystem	
			5. Tag	5. Tag	8. Tag
GOT	482 ± 37 (6)	a	115 ± 19 (6)	453 ± 31 (4)	267 ± 18 (4)
		b	133 ± 21 (6)	371 ± 28 (5)	210 ± 24 (4)
GPT	73 ± 7 (6)	a	62 ± 14 (5)	77 ± 11 (4)	17 ± 5 (4)
		b	47 ± 9 (6)	69 ± 6 (5)	29 ± 5 (4)
TAT	9.6 ± 2.3 (9)	a	4.1 ± 0.7 (7)	4.7 ± 0.5 (6)	3.9 ± 0.8 (5)
		b	4.5 ± 0.6 (8)	7.8 ± 0.6(10)	7.2 ± 0.8 (5)
CPS	23.1 ± 1.7(11)	a	2.9 ± 0.7 (6)	11.5 ± 0.6 (8)	6.3 ± 0.7 (6)
		b	2.1 ± 1.1 (8)	20.7 ± 0.8(10)	17.1 ± 0.4 (6)
OTC	1540 ± 100(12)	a	180 ± 30 (8)	670 ± 90 (8)	420 ± 60 (6)
		b	210 ± 20 (8)	1230 ± 50(10)	860 ± 30 (6)
ARG	5400 ± 900(14)	a	2400 ± 400(12)	4200 ± 800 (9)	3100 ± 300 (6)
		b	2300 ± 500(15)	4900 ± 500(12)	4100 ± 600 (8)
GS	28 ± 4(23)	a	n.d.	10 ± 3(10)	6 ± 2 (9)
		b	5 ± 3(13)	16 ± 2(15)	11 ± 3 (9)

Tabelle 7: Enzymspiegel in frisch isolierten Hepatozyten sowie bei langfristiger Kultivierung in L-15 oder W/AB 77 Medium im perifundierten und im diskontinuierlichen System.

a) L-15 Medium b) W/AB 77 Medium

Die Ergebnisse sind in mU/mg Protein angegeben und stellen den Mittelwert ± Standardabweichung dar (Die Anzahl der Versuche ist in Klammern vermerkt).

wendung von W/AB 77 Medium, auch nach längerer Kultivierung noch hohe Aktivitäten von Harnstoffzyklusenzymen vorliegen.

3.1.4.2. Transaminasen

Die Aktivitätsänderungen der Transaminasen verliefen in diskontinuierlich kultivierten und in perifundierten Hepatozyten weitgehend parallel. Zu Beginn der Kultivierung konnte in beiden Kultursystemen eine weitgehende Konstanz der Enzymspiegel beobachtet werden; bei der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase fand sich bei manchen Kulturen sogar ein vorübergehender Anstieg der spezifischen Aktivität (Abb. 27). Erst bei längerer Kultivierung kam es zu einem allmählichen Absinken der Enzymspiegel (Tabelle 7). Bemerkenswert hierbei ist, daß die Aktivitäten von Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase bei Verwendung von L-15 Medium länger stabil blieben als in W/AB 77 Medium; bei der Tyrosin-Aminotransferase hingegen war dies umgekehrt (Tabelle 7).

3.1.4.3. Glutamin-Synthetase

Die Glutamin-Synthetase zeigte in diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten einen steilen Aktivitätsabfall zwischen den ersten 8 bis 22 Stunden und stabilisierte sich dann bei ungefähr 25 - 30 % des Ausgangswertes (Abb. 28). Dieser Aktivitätsverlust (in W/AB 77 Medium) konnte durch zusätzlich eingeschobene Medienwechsel weder in seiner Lage noch in seinem Ausmaß

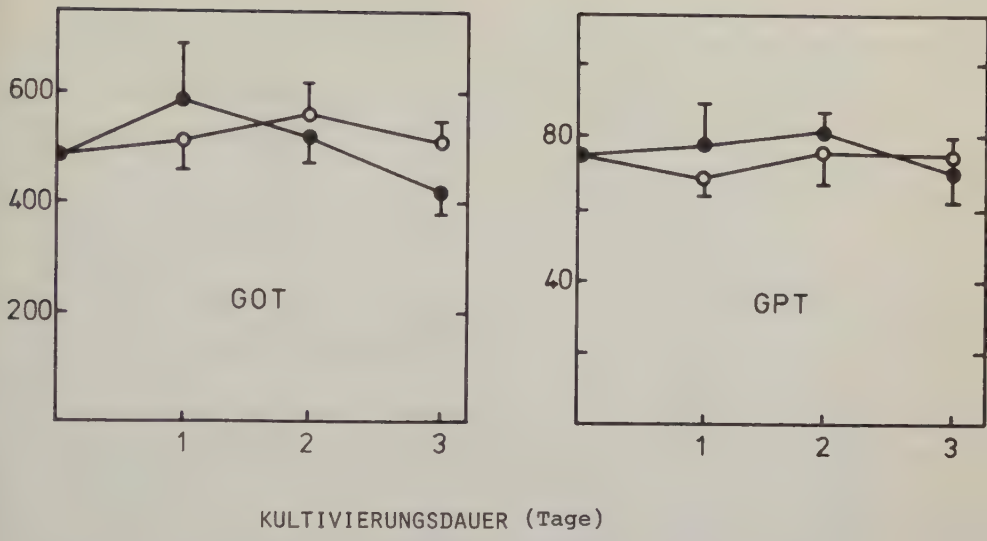


Abb. 27: Zeitlicher Verlauf der Aktivitäten von Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase in perifundierten (O) und diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten (●).

verändert werden. Auch durch Zusatz (bis 20 mM) oder Weglassen von Glutamin konnte die Charakteristik des Aktivitätsverlaufs nicht geändert werden.

In perifundierten Hepatozyten trat dieser Aktivitätsverlust ebenfalls, jedoch in erheblich reduziertem Ausmaß auf, so daß nach einem Tag noch etwa 80 % der Ausgangsaktivität vorliegen. Anschließend sank die Aktivität der Glutamin-Synthetase langsam und gleichförmig ab. Wie Tabelle 7 zu entnehmen ist, sind jedoch auch nach 8 Tagen in W/AB 77 Medium noch etwa 30 % der

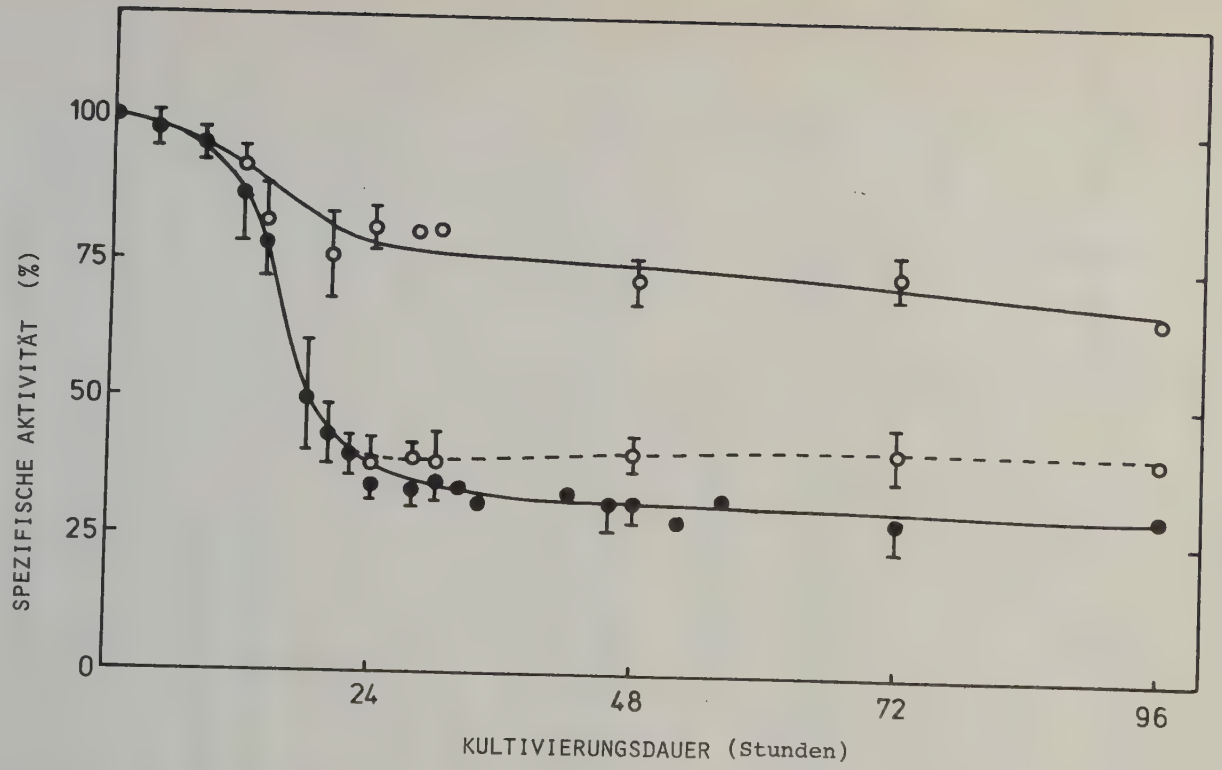


Abb. 28: Zeitlicher Verlauf der Glutamin-Synthetase-Aktivität in perifundierten (○) und diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten (●).

Beginn der Perifusion: durchgezogene Linie (4 h); unterbrochene Linie (20 h) (Anzahl der Versuche: ●: N = 8 - 15; ○: N = 3, Punkte ohne Standardabweichung: N = 2).

Ausgangsaktivität vorhanden.

In Übereinstimmung mit dem diskontinuierlichen System bleiben Änderungen der Glutamin-Konzentration während der gesamten Kultivierungszeit ohne meßbare Folgen.

3.2. Hormonale Regulation der Glutamin-Synthetase

3.2.1. Einfluß verschiedener Hormone auf die Aktivität der Glutamin-Synthetase

Zu Beginn der Untersuchungen wurden verschiedene Hormone daraufhin geprüft, ob sie die Aktivität der Glutamin-Synthetase in kultivierten Hepatocyten zu beeinflussen vermögen. Ausgewählt wurden hierbei einerseits Hormone, deren Beteiligung an der Regulation des Leber-Enzyms durch Studien in vivo wahrscheinlich gemacht oder in Frage gestellt worden war: Gluccorticoide (Hydrocortison (294, 400, 402), Dexamethason (174, 259)), Thyroxin (402) sowie Wachstumshormon (400), andererseits solche Hormone, die im in vitro System an nichthepatischen Zellen oder Gewebeexplantaten zu Änderungen der Glutamin-Synthetase-Aktivität führten: Insulin (253, 254) und Glucagon bzw. cAMP (59, 253, 363).

Getestet wurden außerdem Trijodthyrohin, sowie die adrenergen Hormone Adrenalin und Noradrenalin, für die bislang keine Wirkungen auf die Glutamin-Synthetase beschrieben worden waren, die jedoch in mehr oder weniger enger Beziehung zu einigen der vorgenannten Hormone stehen.

Die Inkubationen erstreckten sich über 24 Sunden und wurden

18 - 20 Stunden nach dem Absetzen der Zellen begonnen. Die spezifische Aktivität der Glutamin-Synthetase wurde jeweils nach 10 Stunden und nach Ende der Inkubation bestimmt.

Alle angeführten Hormone bewirkten keinerlei signifikante Änderung der Enzymaktivität im Vergleich zu Kontrollzellen, wenn sie dem Kulturmedium einzeln zugesetzt wurden (vgl. Tabelle 8). Auch mehrmalige Zugabe der Hormone in Abständen von 4 - 10 Stunden oder eine Verlängerung der Inkubationszeit auf über 48 Stunden brachte keine Änderung dieses Ergebnisses. Eine mögliche Ausnahme bildete Dexamethason, das in manchen Kulturen Stimulationen bis zu 22 % hervorrief, in der Mehrzahl der Versuche jedoch ohne Einfluß auf die Glutamin-Synthetase-Aktivität blieb. In diesem Zusammenhang sollte festgehalten werden, daß Dexamethason bei fast allen Kulturen eine Stabilisierung des gesamten zellulären Proteins pro Petrischale zur Folge hatte und somit auch die Glutamin-Synthetase-Aktivität pro Schale nach der Inkubation deutlich erhöht war.

Nachdem auf diese Weise kein überzeugendes Resultat erreicht worden war, wurden analoge Versuche durchgeführt, bei denen jedoch Kombinationen von zwei oder drei Hormonen eingesetzt wurden. Besonderes Gewicht wurde hierbei dem Dexamethason zugemessen, da diesem Hormon auf Grund seiner permissiven Beeinflussung verschiedener, insbesondere durch cAMP vermittelter Hormonwirkungen (117), als auch infolge seiner unterstützenden Funktion bei der Erhaltung stoffwechselaktiver Hepatocyten in der Kultur eine herausragende Stellung zukommt.

Das Ergebnis dieser Kombinationsversuche ist in Tabelle 8 zusammengefaßt (Zum Vergleich sind die wichtigsten Resultate der Einzelhormonversuche mit aufgenommen). Von allen untersuchten Zweier-Kombinationen erwies sich nur diejenige aus Dexamethason und Wachstumshormon als wirksam. Bei einmaliger Zugabe dieser Hormone ergab sich eine Stimulation der Glutamin-Synthetase-Aktivität von 70 % innerhalb von 24 Stunden. Durch Wiederholung der Hormongabe nach 10 Stunden konnte sogar eine Erhöhung um 105 % erzielt werden. Auch bei der Kombination dreier Hormone schien die Anwesenheit von Dexamethason und Wachstumshormon unbedingt erforderlich zu sein. In Verbindung mit dieser Hormonkombination erwiesen sich sowohl Trijodthyronin als auch Insulin als wirksam, wenngleich die zusätzliche Steigerung mit 25 % bzw. 17 % vergleichsweise gering war.

Die Beteiligung von Wachstumshormon an der Kontrolle der Glutamin-Synthetase-Aktivität warf nun die Frage auf, ob diese Wirkung über somatogene oder lactogene Rezeptoren vermittelt wird, da humanes Wachstumshormon, im Gegensatz zu Wachstumshormon von Nicht-Primaten (169, 289) Bindungsstellen für beide Arten von Rezeptoren besitzt (136).

Nun finden sich somatogene Rezeptoren nach übereinstimmenden Befunden in geringer Anzahl sowohl in männlichen als auch in weiblichen Hepatozyten, während letztere zusätzlich lactogene Rezeptoren enthalten, die dort die Hauptmasse der Bindungsstellen für menschliches Wachstumshormon ausmachen (289, 296, 297). Obwohl in der vorliegenden Arbeit ausschließlich männliche Rat-

Gruppe	Hormone	spezifische Aktivität mU/mg Protein
A	(ohne)	8,7 ± 0,4
	Dexamethason	9,5 ± 1,3
	Human-Wachstumshormon	9,1 ± 0,5
	Trijodthyronin	8,4 ± 0,6
	Dexamethason + Human-Wachstumshormon	14,3 ± 1,2
	Dexamethason + Trijodthyronin	9,4 ± 0,9
	Dexamethason + Human-Wachstumshormon + Trijodthyronin	16,8 ± 1,4
B	(chne)	8,3 ± 0,2
	Insulin	8,9 ± 0,4
	Glucagon	8,3 ± 0,5
	Dexamethason + Insulin	9,1 ± 0,7
	Dexamethason + Glucagon	8,7 ± 0,5
	Dexamethason + Insulin + Human-Wachstumshormon	15,5 ± 1,0

Gruppe	Hormone	spezifische Aktivität mU/mg Protein
	Dexamethason + Glucagon + Human-Wachstumshormon	13,9 ± 1,3
C	(ohne)	8,1 ± 0,5
	Dexamethason + Human-Wachstumshormon	14,7 ± 0,9
	Dexamethason + Schweine-Wachstumshormon	11,9 ± 1,1
	Dexamethason + Prolactin	8,3 ± 0,5

Tabelle 8: Einfluß verschiedener Hormone oder Hormonkombinationen auf die Aktivität der Glutamin-Synthetase.

Hormonkonzentrationen: Dexamethason 2×10^{-6} M, Human-Wachstumshormon 40 µg/ml, Trijodthyronin 10 µg/ml, Insulin 10^{-6} M, Glucagon 10^{-6} M, Schweine-Wachstumshormon 40 µg/ml, Prolactin 10 µg/ml.

Anzahl der Bestimmungen: N = 4

ten verwendet wurden, ist es durchaus denkbar, daß nach einer gewissen Zeit in der Kultur lactogene Rezeptoren auf den Hepatocyten erscheinen, etwa infolge Abwesenheit von Androgenen (12, 289) oder unter dem Einfluß von Östrogenen aus dem Serum, ähnlich wie dies von östrogenbehandelten männlichen Ratten beschrieben wurde (288).

Um diese Frage entscheiden zu können, wurden analoge Parallelinkubationen mit menschlichem Wachstumshormon, Schweine-Wachstumshormon und Prolactin durchgeführt. In allen Ansätzen war gleichzeitig Dexamethason anwesend (Tabelle 8). Schweine Wachstumshormon bewirkte eine deutliche Stimulation der Glutamin-Synthetase - wenngleich geringer als das menschliche Hormon - , während Prolactin keine Aktivitätssteigerung hervorrief. Dieser Befund berechtigt zu dem Schluß, daß die Wirkung des Wachstumshormons über somatogene Rezeptoren vermittelt wird.

3.2.2. Zeitabhängigkeit der Wirkung von Wachstumshormon und Dexamethason

Um ein genaueres Bild der Wirkung von Wachstumshormon und Dexamethason auf die Aktivität der Glutamin-Synthetase zu erhalten, wurde der zeitliche Verlauf der Enzymaktivität über 50 Stunden gemessen (Abb. 29). Die Inkubation wurde zur selben Zeit begonnen wie in den vorangegangenen Experimenten. Bei dem in Abb. 29 gezeigten Versuch wurde das Medium nach 22 und 46 Stunden gewechselt; die Hormonzugabe erfolgte mit den Medien-

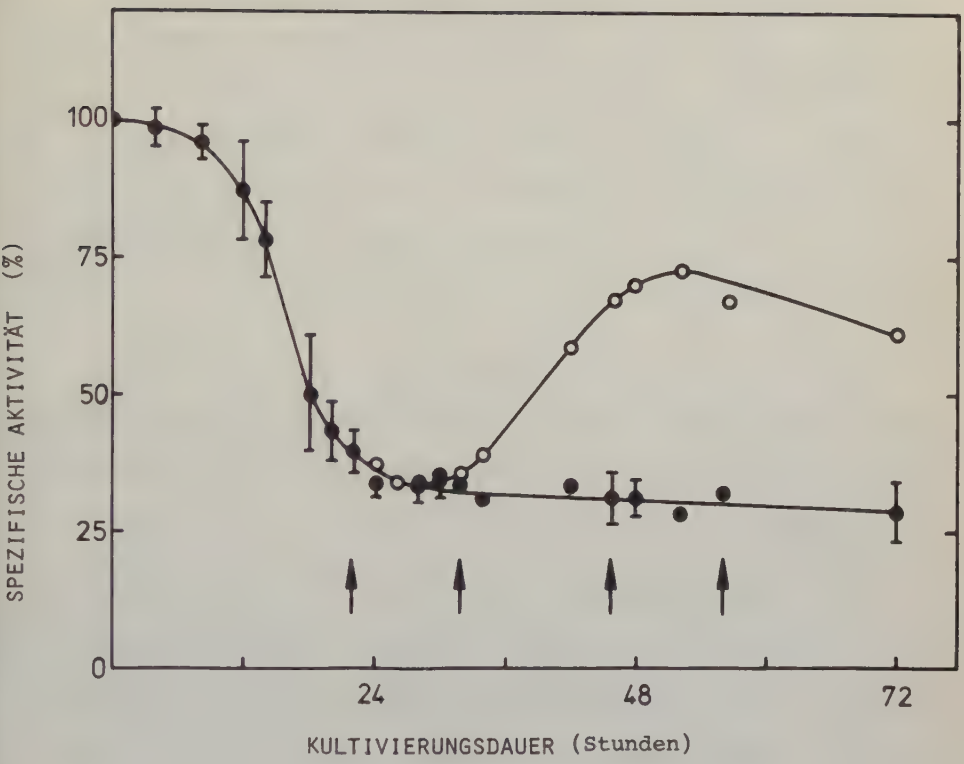


Abb. 29: Zeitlicher Verlauf der Stimulation der Glutamin-Synthetase durch ein Gemisch aus Dexamethason und Human-Wachstumshormon.

Kontrolle (O), Dexamethason 2 x 10^{-6} M und Human-Wachstumshormon 4 µg/ml (●); die Pfeile zeigen die Hormonzugabe an.
(Der Verlauf der Basalaktivität ist Abb. 28 entnommen)

wechseln und wurde jeweils 10 Stunden später wiederholt (Pfeile). Es zeigte sich, daß die Stimulation der Enzymaktivität erst nach einer längeren lag-Phase einsetzt. Sie durchlief nach ca. 30 Stunden ein Maximum und ging danach - trotz erneuter Hormongabe - allmählich zurück. Ein völlig analoger Verlauf, jedoch mit geringerer Steigerung der Enzymaktivität, fand sich, wenn die zwischen die Medienwechsel eingeschobenen Hormonapplikationen ausgelassen wurden (vgl. auch Tabelle 9).

In einer zweiten Versuchsserie wurde der Beginn der Inkubation variiert. Damit sollte insbesondere geklärt werden, ob der Aktivitätsabfall der Glutamin-Synthetase zu Beginn der Kultivierung (Abschn. 3.1.4.3.) durch das Hormongemisch aufgehalten oder verzögert werden kann. Bei dem in Tabelle 9 wiedergegebenen Versuch wurden die Petrischalen nach dem ersten Medienwechsel (4 Stunden) in drei Gruppen aufgeteilt. Gruppe A wurde mit bzw. ohne das Gemisch aus Wachstumshormon und Dexamethason für weitere 20 Stunden inkubiert. Gruppe B erhielt 10 Stunden später neues Kulturmedium mit oder ohne Hormongemisch und wurde für weitere 24 Stunden inkubiert. Bei Gruppe C wurde das Medium 18 Stunden später gewechselt und die Inkubation mit oder ohne Hornmongemisch über zusätzliche 32 Stunden hinweg fortgesetzt. In einigen Segmenten der Petrischalen wurde die Hormongabe 10 Stunden nach dem Medienwechsel wiederholt (++). Zu den aufgeführten Zeitpunkten wurden jeweils 4 Segmente für die Aktivitätsbestimmung der Glutamin-Synthetase und der Tyrosin Aminotransferase aufgearbeitet.

Gruppe	Kultivierungs-dauer	Hormon-zugabe	Zeit nach Hormongabe	Spezifische Aktivität
	h		h	mU/mg Protein
A	10	-	-	23.4 ± 1.3.
	10	+	6	23.9 ± 1.6
	24	-	-	8.1 ± 0.7
	24	+	20	9.4 ± 1.1
B	24	-	-	9.6 ± 0.4
	24	+	10	9.2 ± 0.6
	38	-	-	7.4 ± 0.4
	38	+	24	7.3 ± 0.3
C	30	-	-	7.9 ± 0.4
	30	+	8	9.5 ± 0.6
	46	-	-	7.5 ± 0.5
	46	+	24	13.2 ± 1.3
	46	++	24 (14)	16.6 ± 1.1
	54	-	-	6.8 ± 0.3
	54	+	32	13.9 ± 0.9
	54	++	32 (22)	17.7 ± 2.4

Tabelle 9: Einfluß der Kultivierungsdauer auf die Hormonantwort der Hepatocyten

Hormonkonzentration: Dexamethason 2 x 10^{-6}M, Human-Wachstumshormon 4 µg/ml.
Anzahl der Bestimmungen: N = 4
(Erläuterung s. Text)

Der Versuch zeigt eindeutig, daß die Zellen zu Beginn der Kultivierung nicht mit einer hormonbedingten Änderung der Glutamin-Synthetase-Aktivität reagieren. Offensichtlich setzt eine solche Antwort erst nach ungefähr 20 Stunden in der Kultur ein. Dieser Prozeß erstreckt sich über mindestens 10 Stunden und führt in der Zeit zwischen 18 und 28 Stunden nach dem Absetzen der Kultur zu einer stetigen Zunahme der Hormonantwort (Tabelle 10). Die Stimulation der Glutamin-Synthetase wurde hierbei jeweils 24 Stunden nach Hormongabe gemessen.

Zeitpunkt der Hormongabe (h)	Spezifische Aktivität (% Kontrolle)	
18	113	(110,116)
20	121	(119,123)
22	143	(137,145,147)
24	152	(149,155)
26	176	(172,175,181)
28	171	(166,176)

Tabelle 10: Stimulation der Glutamin-Synthetase-Aktivität durch die Hormonmischung als Funktion der Kultivierungsdauer.

Hormonkonzentrationen s. Tabelle 9
Expositionszeit: 24 h

Im Gegensatz zur Glutamin-Synthetase zeigte die Tyrosin Aminotransferase zu allen Zeitpunkten eine deutliche Aktivitätszunahme in Anwesenheit von Dexamethason. Somit scheint das Ausbleiben der Glutamin-Synthetase-Stimulation im wesentlichen durch eine Unempfindlichkeit der Hepatocyten gegenüber Wachstumshormon während der Initialphase der Kultur bedingt zu sein.

Darüber hinaus wurde beobachtet, daß auch nach mehr als 50 Stunden in Kultur keine Stimulation der Glutamin-Synthetase mit Wachstumshormon und Dexamethason möglich ist.

3.2.3. Einfluß der Glutaminkonzentration auf die hormonelle Stimulation der Glutamin-Synthetase

Bereits in Abschnitt 3.1.4.3. wurde beschrieben, daß die Aktivitätsänderung der Glutamin-Synthetase in unstimmulierten Hepatocyten unabhängig von der Glutaminkonzentration im Kulturmedium verläuft. Die Möglichkeit der hormonellen Stimulation der Glutamin-Synthetase ließ eine Wiederholung der Versuche unter derartigen Bedingungen angezeigt erscheinen, um eine eventuelle Wechselwirkung mit dem Stimulationsvorgang oder einen Einfluß nach erfolgter Aktivitätserhöhung (etwa eine Beschleunigung des Niedergangs) zu erkennen.

Zusammenfassend läßt sich aus diesen Versuchen feststellen, daß weder eine Entfernung von Glutamin mittels Glutaminase noch Konzentrationen bis zu 20 mM einen Einfluß auf die Glutamin-Synthetase-Aktivität ausübten, und zwar sowohl während der hormonellen Stimulation, als auch im Zeitraum danach.

3.2.4. Einfluß der Zelldichte auf die Stimulation der Glutamin-Synthetase

Während der in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Versuche war beobachtet worden, daß in Petrischalen mit relativ niedrigem Proteingehalt (d.h. also mit geringerer Zelldichte) eine besonders hohe Stimulation der Glutamin-Synthetase als Antwort auf Wachstumshormon und Dexametason gemessen werden konnten. Die Vermutung einer inversen Relation zwischen Zelldichte und Ausmaß der hormonellen Stimulierbarkeit konnte durch eine systematische Variation der Zelldichte bestätigt werden (Tabelle 11).

Zelldichte (Zellen/cm^2)	Spezifische Aktivität (% Kontrolle)
$1{,}5 \times 10^5$ (1/1)	168 ± 7 (5)
$1{,}1 \times 10^5$ (3/4)	177 ± 3 (3)
$0{,}75 \times 10^5$ (1/2)	194 ± 11 (5)

Tabelle 11: Einfluß der Zelldichte auf die Stimulation der Glutamin-Synthetase

Hormonkonzentrationen s. Tabelle 9
(Hormongabe nach 23 h in Kultur)

Expositionszeit: 24 h

Bemerkung: Auf Grund dieses Ergebnisses wurde bei den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen (sofern nicht anders vermerkt) nur noch 3/4 der üblichen Zelldichte eingesetzt (d.i. 0,11 x 10^6 Zellen/cm^2).

3.2.5. Einfluß von frischem und "verbrauchtem" Kulturmedium

Das Ergebnis der Versuche zum Einfluß der Zelldichte gab Anlaß zu der Vermutung, daß die Verarmung an einem oder mehrerer Bestandteilen des Kulturmediums bei dichterer Aussaat der Zellen der Grund für die geringere Stimulation in solchen Kulturen sein könnte. Um dies abzuklären, wurden Kulturen in normaler und reduzierter Dichte sowohl auf frisches, als auch auf "verbrauchtes" Medium umgesetzt und in Gegenwart der Hormonmischung weitere 22 Stunden lang inkubiert. Das "verbrauchte" Medium wurde durch Inkubation mit kultivierten Hepatocyten für 10 Stunden erhalten.

In beiden Fällen konnte der bereits beschriebene Effekt der Zelldichte beobachtet werden, wohingegen kein Unterschied zwischen den verschiedenen Medien zu erkennen war. Hierdurch wurde die Beteiligung einer Komponente des Mediums an der hormonbedingten Stimulation weitgehend ausgeschlossen. Insbesondere scheint auch der Einfluß der Zelldichte von den durch die Stoffwechselaktivität der Zellen selbst hervorgerufenen Änderungen im Kulturmedium unabhängig zu sein.

3.2.6. Einfluß der Konzentration des Wachstumshormons auf die Stimulation der Glutamin-Synthetase

Abb. 30 zeigt die Abhängigkeit der Aktivitätssteigerung der Glutamin-Synthetase von der Konzentration des Wachstumshormons bei gleichzeitiger Anwesenheit von 2×10^{-6}M Dexametason. Die Abhängigkeit wurde bei normaler und bei auf die Hälfte reduzierter Zelldichte aufgenommen. Die Inkubationsdauer betrug stets 24 Stunden. Bemerkenswert an den gezeigten Kurven ist einmal der Übergang zu einem Plateau oberhalb einer Konzentration von 2 - 3 µg/ml, zum anderen die Tatsache, daß bei geringerer Zelldichte sich nur das Ausmaß der Stimulation erhöht, nicht jedoch eine Verschiebung des Kurvenprofils eintritt.

Beide Charakteristika können dahingehend interpretiert werden, daß das Wachstumshormon seine Wirkung schneller entfaltet, als es durch die kultivierten Zellen inaktiviert wird.

Wie oben bereits mehrfach erwähnt, läßt sich die Stimulation durch eine zweite Zugabe von Wachstumshormon nach etwa zehn Stunden weiter steigern. Auch für diese Hormongabe wurde die Konzentrationsabhängigkeit gemessen. Das hieraus resultierende Profil war mit dem Kurvenverlauf von Abb. 30 nahezu identisch. Es sei an dieser Stelle noch vermerkt, daß bei erneuter Zugabe von Wachstumshormon im Zeitraum von 2 - 8 Stunden nach der Applikation des Hormongemisches kein Einfluß auf die Steigerung der Enzymaktivität gefunden werden konnte.

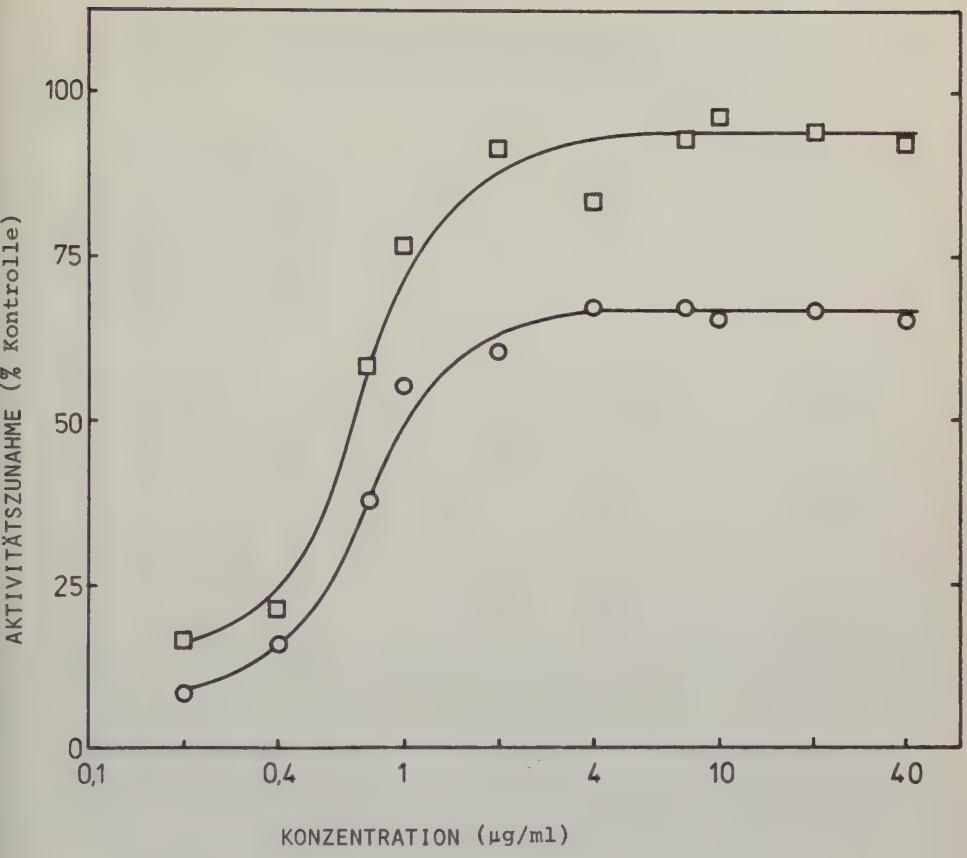


Abb. 30: Stimulation der Glutamin-Synthetase durch das Hormongemisch aus Dexamethason und Human-Wachstumshormon in Abhängigkeit von der Konzentration des Human-Wachstumshormons.

Normale Zelldichte (O), halbe Zelldichte (□) Konzentration des Dexamethasons: 2×10^{-6} M
Beginn der Hormonstimulation: 22 h
Expositionszeit: 24 h

3.2.7. Einfluß der Konzentration von Dexamethason auf die Stimulation der Glutamin-Synthetase

Bei den Untersuchungen zur Abhängigkeit der Stimulation der Glutamin-Synthetase von der Konzentration des Dexamethasons in der Hormonmischung wurde zum Vergleich stets Tyrosin Aminotransferase mitgemessen. Die Inkubationen erstreckten sich jeweils über einen Zeitraum von 24 Stunden.

In Tabelle 12 A sind die erhaltenen Werte in Prozent der Stimulation bei 5×10^{-6} M Dexamethason eingetragen. Es zeigte sich, daß die Steigerung der Glutamin-Synthetase-Aktivität mit abnehmender Dexamethason-Konzentration schneller zurückgeht als die Induktion der Tyrosin Aminotransferase. Ferner läßt sich folgern, daß Konzentrationen, die bei der Tyrosin Aminotransferase zu maximaler Induktion nach 24 Stunden führen, auch bei der Glutamin-Synthetase als maximal effektiv erscheinen.

Nun unterscheidet sich allerdings der Aktivitätsverlauf der Tyrosin Aminotransferase nach Hormongabe (Glucocorticoid) beträchtlich von dem der Glutamin-Synthetase. Bei höheren Glucocorticoidkonzentrationen wird die maximale Induktion bereits nach 8 - 10 Stunden erreicht, anschließend bleibt die Aktivität auf diesem Niveau erhalten oder nimmt mehr oder weniger schnell ab, je nachdem, ob eine ausreichende Hormonmenge während der gesamten Inkubationszeit vorhanden ist oder nicht. Die Enzymaktivität der Tyrosin Aminotransferase nach 24 Stunden ist somit ein empfindlicher Indikator auf die Anwesenheit eines Glucocorticoids.

Die Wirkung einer wiederholten Zugabe suboptimaler Dexametha-

Konzentration (M)		Glutamin-Synthetase (% Stimulation)	Tyrosin Aminotransferase (% Stimulation)
A	5×10^{-6}	100	100
	2×10^{-6}	104	101
	10^{-6}	91	103
	10^{-7}	23	45
	10^{-8}	0	18
B	10^{-7} (2)	56	97
	10^{-7} (3)	95	114
	10^{-8} (2)	20	43
	10^{-8} (4)	87	75

Tabelle 12: Stimulation der Glutamin-Synthetase durch das Hormongemisch aus Wachstumshormon und Dexamethason in Abhängigkeit von der Dexamethason-Konzentration.

Konzentration von Human-Wachstumshormon: 4 µg/ml
Beginn der Hormonstimulation: 23 h
Expositionszeit: 24 h
(In Teil B ist die Anzahl der verschiedenen Dexamethasongaben in Klammern angegeben. Die Hormongaben teilten die Expositionszeit in jeweils gleichlange Intervalle.)

sonkonzentrationen ist in Tabelle 12 B aufgeführt. (Bezugswert ist wiederum die Stimulation bei 5 x 10^{-6} M Dexamethason). Offensichtlich läßt sich im Falle der Glutamin-Synthetase durch mehrfache Anwendung auch sehr geringer Konzentrationen an Dexamethason eine nahezu maximale Reaktion auf die Hormonmischung erhalten. Im Gegensatz hierzu gilt dies bei der Tyrosin Aminotransferase nicht mehr, wenn so geringe Konzentrationen wie 10^{-8} M Dexamethason gewählt werden.

Die Wirkung des Dexamethasons in Kombination mit Wachstumshormon scheint folglich auch bei geringen Konzentrationen voll entfaltet zu werden und ist lediglich an die Voraussetzung geknüpft, daß jederzeit eine effektive Konzentration vorliegt.

3.2.8. Einfluß der Präinkubation mit Dexamethason

Ein tieferer Einblick in die Rolle von Dexamethason und Wachstumshormon sollte an Hand von Experimenten erhalten werden, bei denen die Hepatozyten vor Gabe der Hormonmischung verschieden lang einem der beiden Hormone ausgesetzt sind.

Abb. 31 zeigt das Ergebnis der Vorinkubation mit Dexamethason. Es ist klar zu erkennen, daß mit zunehmender Dauer der Vorinkubation eine progressive Verkürzung der lag-Phase nach Zugabe von Wachstumshormon eintritt, bis hin zu deren völligem Verschwinden bei einer Vorinkubation von acht Stunden. (Ob in letzterem Fall zusätzlich eine kürzere Verzögerung des Beginns der Stimulation nach Zugabe des Wachstumshormons auftritt, kann infolge der Schwankung der Meßwerte nicht klar entschie-

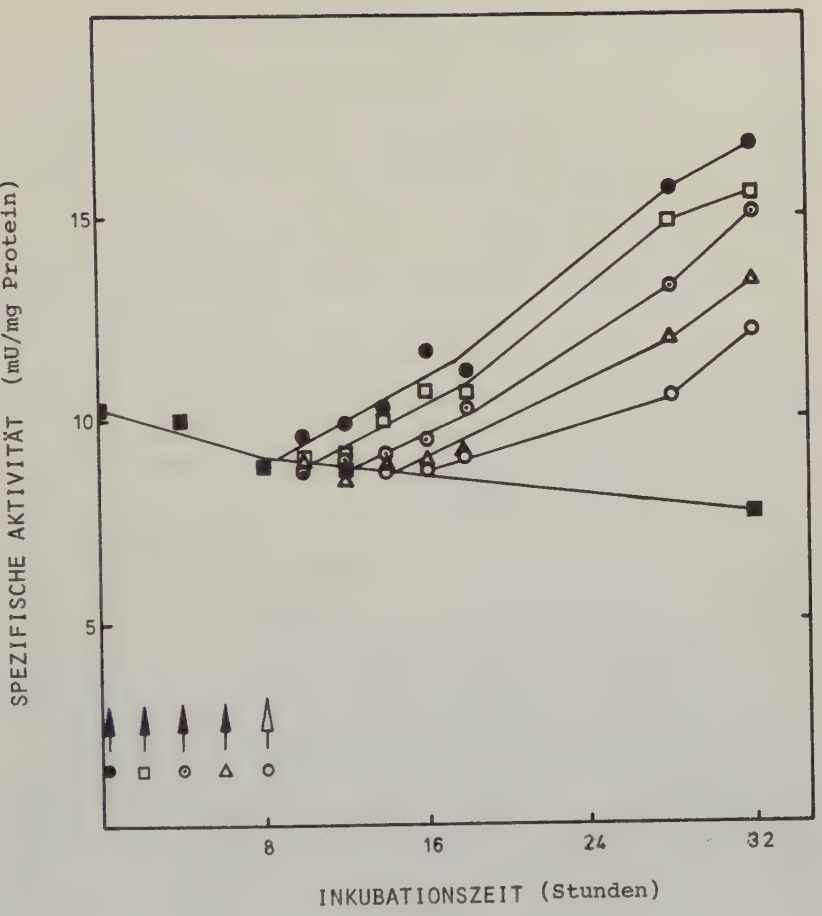


Abb. 31: Stimulation der Glutamin-Synthetase durch das Hormongemisch in Abhängigkeit von der Dauer einer Vorinkubation mit Dexamethason.

Dauer der Vorinkubation: 0 h (○), 2 h (△), 4 h (⊙), 6 h (□), 8 h (●). Kontrolle (■).
(Der offene Pfeil kennzeichnet die Zugabe der Hormonmischung.)

den werden.)

Die Dauer der lag-Phase des Stimulationsprozesses konnte aus diesem und einigen anderen Versuchen ermittelt werden. Sie beträgt zwischen sechs und acht Stunden.

Inkubationsprotokoll für den Versuch von Abb. 31 (S. 135)

Die Hepatozyten wurden 30 Stunden lang normal kultiviert. Nach dieser Zeit, die dem Zeitpunkt "Null" auf der Zeitachse der Abbildung entspricht, erhielten die Zellen frisches Kulturmedium. Unmittelbar nach dem Wechsel (●) oder nach 2 Stunden (□), 4 Stunden (⊙) und 6 Stunden (△) wurde Dexamethason (Endkonzentration 2×10^{-6} M) zu den verschiedenen Petrischalen pipettiert (geschlossene Pfeile). Einige Petrischalen wurden ohne Zusätze als Kontrollen mitgeführt (■). Nach 8 Stunden (○) erhielten alle Schalen (außer der Kontrolle) eine Mischung von Wachstumshormon (4 µg/ml), Dexamethason (2×10^{-6} M) und Trijodthyronin (10 µg/ml) (offener Pfeil). Nach den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und die Aktivität der Glutamin-Synthetase in den Zellhomogenaten bestimmt. Die Punkte stellen die Mittelwerte von 2 Segmenten einer Petrischale dar.

3.2.9. Einfluß der Präinkubation mit Wachstumshormon

Die Vorinkubation mit Wachstumshormon ergab einen völlig anderen Verlauf der Stimulationskurven (Abb. 32).
Unabhängig von der Dauer der Vorinkubation begann die Stimulation einheitlich erst nach 7 - 8 Stunden nach der Gabe der Hormonmischung. Dies bestätigt erneut, daß die lag-Phase der Wirkung des Dexamethasons zuzuschreiben ist.

Unterschiede zwischen den verschieden lang vorinkubierten Kulturen zeigten sich erst im weiteren Verlauf des Experiments: die Aktivitätszunahme der Glutaminsynthetase nach dem für alle gleichen "Startpunkt" war um so größer, je länger mit Wachstumshormon vorinkubiert worden war. Die optimale Wirkung schien nach einer Vorinkubationsdauer von sechs Stunden erreicht zu sein.

Im Gegensatz zum vorstehenden Versuch, bei dem das Ergebnis unabhängig davon ausfiel, ob mit Wachstumshormon oder der Hormonmischung "gestartet" worden war, war bei diesen die Zugabe von Hormonmischung, d.h. also eine erneute Zugabe von Wachstumshormon, unbedingt erforderlich. Ein ähnliches Experiment ohne wiederholte Anwendung dieses Hormons ergab, daß eine Stimulation der Glutaminsynthetase nur dann erfolgte, wenn Wachstumshormon nicht früher als zwei Stunden vor Dexamethason gegeben worden war.

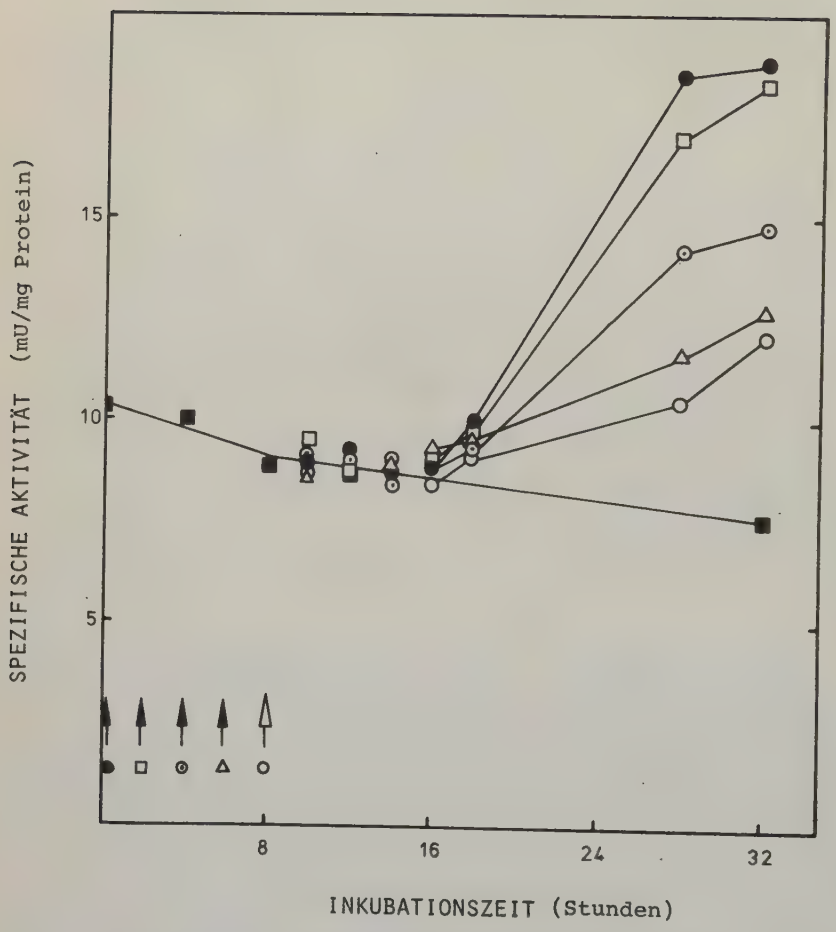


Abb. 32: Stimulation der Glutamin-Synthetase durch das Hormongemisch in Abhängigkeit von der Dauer einer Vorinkubation mit Human-Wachstumshormon.

Einzelheiten analog Abb. 31.

3.2.10. Einfluß von Inhibitoren der Proteinbiosynthese während der Präinkubation

Der Einsatz von Inhibitoren der Proteinbiosynthese (Cycloheximid und Puromycin) während der Präinkubation sollte darüber Aufschluß geben, ob eine aktive Proteinsynthese für die Wirkung der Hormone erforderlich ist. Die Versuche wurden analog zu den beschriebenen Präinkubationsexperimenten durchgeführt, die Enzymaktivität jedoch nur 24 Stunden nach Gabe der Hormonmischung gemessen. Die Inhibitoren wurden entweder während der gesamten Vorinkubation (I1) oder während der 2. Hälfte (I2) eingesetzt (Abb. 33).

Bei Vorinkubation mit Dexamethason (Abb. 33 A) führten die Hemmstoffe zu einer völligen Aufhebung des Präinkubationseffekts. Zwischen den Varianten I1 und I2 fand sich hierbei kein signifikanter Unterschied.

Im Falle des Wachstumshormons (Abb. 33 B) konnte der Einfluß der Präinkubation durch die Hemmstoffe nur teileweise unterdrückt werden, selbst wenn diese gleichzeitig mit dem Hormon gegeben wurden (I1). Erfolgte die Zugabe der Inhibitoren erst während der zweiten Hälfte der Vorinkubation (I2), so wurden mehr als 80 % der bei ungehinderter Vorbehandlung gemessenen Steigerung erreicht.

In allen Fällen zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen mit Cycloheximid oder Puromycin. Die Hemmwirkung schien bei beiden Substanzen voll reversibel zu sein, obwohl Konzentrationen eingesetzt wurden, die die Proteinbiosynthese zu über 90 % blockieren.

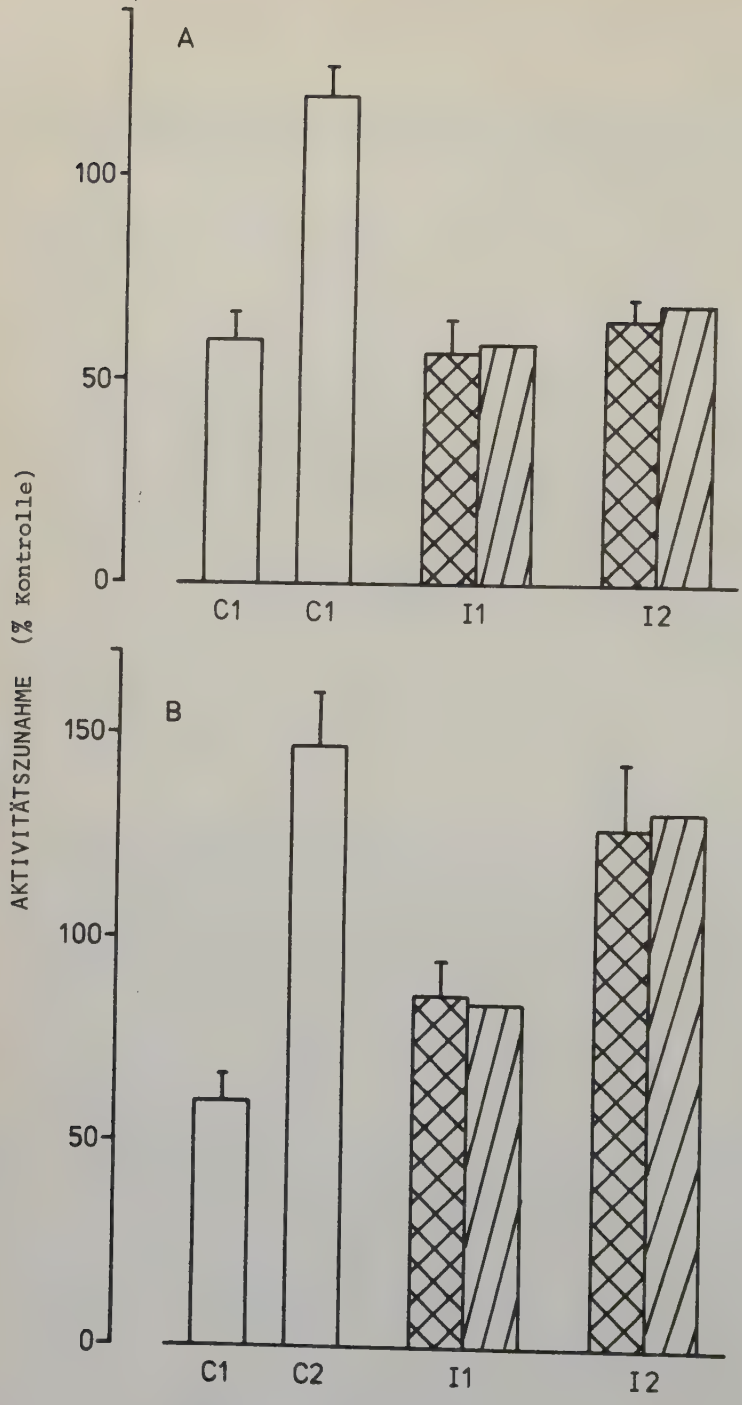


Abb. 33 (Text s. S. 139)

3.2.11. Wechselwirkung von Insulin mit der Stimulation der Glutamin-Synthetase durch das Hormongemisch aus Dexamethason und Wachstumshormon

Über eine Steigerung der Stimulation der Glutamin-Synthetase bei zusätzlicher Gegenwart von Insulin um 17 - 20 % war bereits in Abschnitt 3.2.1. berichtet worden. Im Gegensatz hierzu war bei einigen der vorstehenden Versuche aufgefallen, daß die Wirkung von Wachstumshormon und Dexamethason verringert war, wenn die Hepatozyten über die ersten 4 Stunden hinaus unter der Einwirkung von Insulin standen. Durch eine systematische Variation der Anwesenheitsdauer von Insulin während des ersten Kulturtages sollte diese Wechselwirkung näher charakterisiert werden.

Als Ergebnis kann festgehalten werden, daß in Gegenwart von Insulin eine Beschleunigung des initialen Aktivitätsabfalls der Glutamin-Synthetase eintritt (Abb. 34). Durch eine erneute Gabe von Insulin mit dem 2. Medienwechsel nach 16 Stunden wurde der weitere Verlauf der Basalaktivität des Enzyms jedoch nur noch

---

Abb. 33: Einfluß von Cycloheximid und Puromycin während der Vorinkubation mit Dexamethason (A) oder Human-Wachstumshormon (B) auf die Stimulation durch das Hormongemisch.

Cycloheximid 1 µg/ml (⊠), Puromycin 23 µg/ml (▨)
Erläuterungen s. Text 3.2.10.
(Abb. 33 s. S. 140)

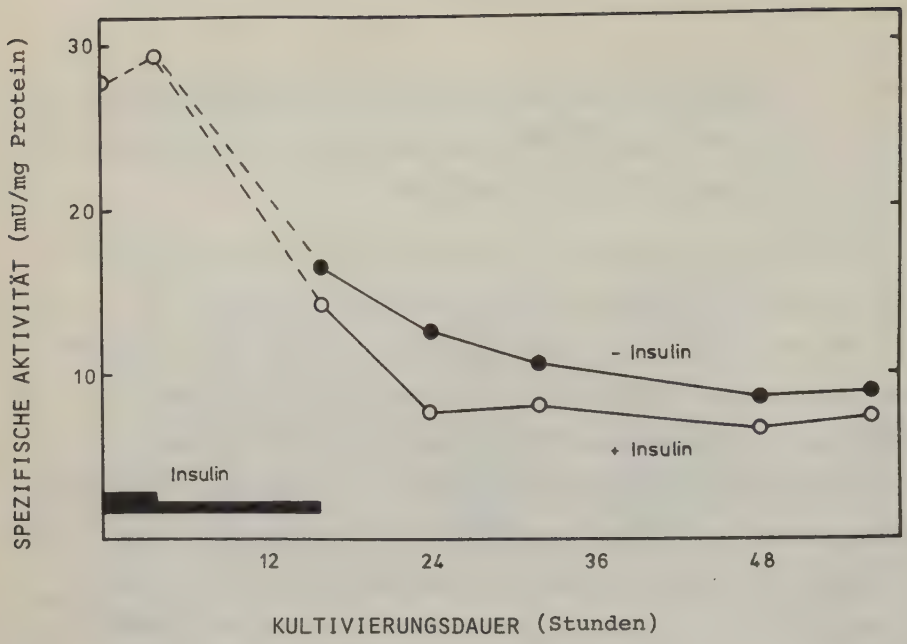


Abb. 34: Einfluß von Insulin auf die Basalaktivität der Glutamin-Synthetase

Konzentration des Insulins: 10^{-6} M
Dauer der Einwirkung von Insulin zu Beginn der Kultivierung: 0 - 4 h (●), 0 - 16 h (○).

unwesentlich beeinflußt.

Anders verhielt es sich, wenn den Kulturen zusätzlich nach 24 und 32 Stunden ein Gemisch aus Wachstumshormon und Dexamethason zugesetzt und das Ausmaß der Stimulation nach weiteren 24 Stunden gemessen wurde (Tabelle 13). Hier wurde mit zunehmender Dauer der Insulineinwirkung eine progressive Reduktion der Stimulation festgestellt. Dies galt jedoch nur für den Zeitraum vor Zugabe der Hormonmischung. Wurde Insulin über diesen Zeitpunkt hinaus angeboten, so konnte durchaus

Dauer der Insulineinwirkung (Stunden)			Aktivitätszunahme der Glutamin-Synthetase nach 24 Stunden Hormon[1] - Exposition (% Kontrolle)	
0 - 4	4 - 16	16 - 24	24 - 48[1]	48 - 56[2]
+	-	-	217	207
+	-	+	142	189
+	+	-	150	141
+	+	+	110	147

Tabelle 13: Einfluß der Einwirkungsdauer von Insulin zu Beginn der Kultivierung auf die Stimulation der Glutamin-Synthetase durch das Hormongemisch.

1) Hormonmischung: Dexamethason 2 x 10^{-6} M, Human-Wachstumshormon 4 µg/ml, Trijodothyronin 10 µg/ml.
2) Expositionsperiode

wieder ein geringfügiges Ansteigen der Stimulation beobachtet werden.

Offensichtlich ist die Wechselwirkung zwischen Insulin und dem Hormongemisch aus Wachstumshormon und Dexamethason bezüglich der Stimulation der Glutamin-Synthetase sehr komplex. Insbesondere scheint die Wirkung von Insulin davon abhängig zu sein, ob die Stimulation des Enzyms bereits initiiert ist oder nicht.

3.2.12. Stimulation der Glutamin-Synthetase in der Perifusion

Obwohl die Perifusion - aus Gründen des Aufwandes und der Vereinfachung - für die Untersuchung der hormonellen Regulation der Glutamin-Synthetase nicht genutzt wurde, sollte an Hand einiger Experimente geklärte werden, ob und in wie weit eine Übereinstimmung zwischen der Wirkung von Wachstumshormon und Dexamethason in beiden Kultursystemen besteht.

Nachdem verschiedene Versuche zeigten, daß die Anwendung beider Hormone bei "normal" perifundierten Hepatozyten (Beginn der Perifusion nach 4 Stunden) nur geringe Aktivitätsänderungen hervorrief, wurde dasselbe an "spät" perifundierten Zellen (Beginn nach 20 Stunden) wiederholt, da diese einen ähnlichen Enzymspiegel aufweisen wie diskontinuierlich kultivierte Hepatozyten.

Eine Gegenüberstellung der Befunde von "normal" und "spät" perifundierten Hepatozyten aus derselben Präparation ist in Tabelle 14 vorgenommen. Die kultivierten Zellen wurden also nach 4 bzw. 20 Stunden perifundiert, erhielten beide jeweils nach insgesamt 24 Stunden das Gemisch aus Wachstumshormon und Dexamethason und wurden nach weiteren 24 Stunden für die Aktivitätsmessung der Glutamin-Synthetase aufgearbeitet.

Während sich bei den "normal" perifundierten Hepatozyten wiederum nur eine geringe Stimulation zeigte, war diese bei den "spät" perifundierten Zellen von ähnlichem Ausmaß, jedoch etwas höher als in der diskontinuierlichen Kultur (vgl. 3.2.1. u. 3.2.2.). Aus diesen Messungen kann geschlossen werden, daß perifundierte und diskontinuierlich kultivierte Hepatozyten

Beginn der Perifusion (h)	Hormon Gemisch +)	Spezifische Aktivität (mU/mg Protein)	Stimulation (%)
4	-	20,7 ± 1,6	
	+	26,0 ± 2,3	26
20	-	9,8 ± 1,3	
	+	21,9 ± 1,7	123

Tabelle 14: Stimulation der Glutamin-Synthetase durch Dexamethason und Human-Wachstumshormon in perifundierten Hepatozyten in Abhängigkeit vom Beginn der Perifusion.

+) Dexamethason 2 x 10^{-6} M, Human-Wachstumshormon 4 µg/ml.

Beginn der Stimulation: 24 h nach Absetzen der Zellen

Expositionszeit: 24 h

prinzipiell gleichartig auf die Einwirkung von Wachstumshormon und Dexamethason mit einer Stimulation der Glutamin-Synthetase antworten. Daneben jedoch wird deutlich, daß eine solche Stimulation von dem erhöhten Niveau des Enzyms aus, wie es bei früh einsetzender Perifusion gehalten werden kann (vgl. Abschn. 3.1.4.3.), kaum noch möglich ist.

3.3. Hormonale Regulation der Enzyme des Harnstoffzyklus

Bereits während des Aufbaustadiums der Perifusion war beobachtet worden, daß die Aktivität der Arginase in Gegenwart von Glucagon erhöht war, während gleichzeitig im diskontinuierlichen System keine Steigerung der Enzymaktivität festgestellt werden konnte. Letztere Beobachtung stimmte gut mit den Ergebnissen von Lin und Snodgrass überein, die ebenfalls versucht hatten, an gewöhnlichen Primärkulturen von Hepatocyten eine Glucagonwirkung auf die Harnstoffzyklusenzyme nachzuweisen, jedoch keine (201) oder nur sehr ungenügende (356) Hinweise auf einen Einfluß dieses Hormons erhalten hatten.

Die Perifusion erschien daher - aus zunächst ungeklärtem Grund - nicht nur als das geeignetere, sondern als das einzig adäquate System *in vitro* zur Entscheidung der Frage, welche Bedeutung Glucagon für die Regulation der Enzyme des Harnstoffzyklus besitzt, dessen Beteiligung trotz jahrelanger Bemühungen nicht als endgültig gesichert gelten konnte (357).

Im Falle einer Bestätigung sollte mit Hilfe dieses Systems versucht werden, nähere Aufschlüsse über die Wirkungsweise dieses Hormons zu erhalten. Darüber hinaus war es von Interesse, durch vergleichende Messungen an den beiden Kultursystemen einen Überblick über Ausmaß und Ursache der erstaunlichen Abhängigkeit der Glucagonwirkung von der Wahl des Kultursystems zu gewinnen.

3.3.1. Der Einfluß von Glucagon auf die Arginase in perifundierten und diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten

Erste Untersuchungen über die Wirkung von Glucagon beschränkten sich auf die Arginase. An Hand von Messungen des zeitlichen Verlaufs und der Abhängigkeit der Hormonantwort von der Kultivierungsdauer sollte insbesondere herausgearbeitet werden, ob der Unterschied zwischen den verschiedenartig kultivierten Zellen nur ein vorübergehendes oder ein dauerhaftes Phänomen darstellt.

Die vergleichenden Messungen wurden unter möglichst ähnlichen Bedingungen durchgeführt (Verwendung derselben Zellsuspension, des gleichen Kulturmediums u.s.w.). Sie erstreckten sich über einen Zeitraum von insgesamt drei Tagen und wurden, beginnend am 2. Kulturtag, abschnittsweise über jeweils 24 Stunden nach Hormongabe ausgeführt.

Wie Abb. 35 zu entnehmen ist, fand sich in diskontinuierlich kultivierten Zellen keine signifikante Stimulierung der Arginaseaktivität innerhalb der Inkubationszeit. Auch eine Verlängerung um weitere 24 Stunden verbunden mit erneuter Hormonzugabe und Medienwechsel erbrachte nur geringe Aktivitätssteigerungen. Ferner war das Ergebnis unabhängig davon, ob Glucagon nur zu Beginn oder mit mehrmaliger Wiederholung (nach 4 und 8 Stunden) zugegeben wurde.

Im perifundierten System hingegen war ein deutlicher Anstieg der Arginaseaktivität innerhalb der ersten 24 Stunden nach Supplementation des Hormons zu beobachten. Am zweiten und

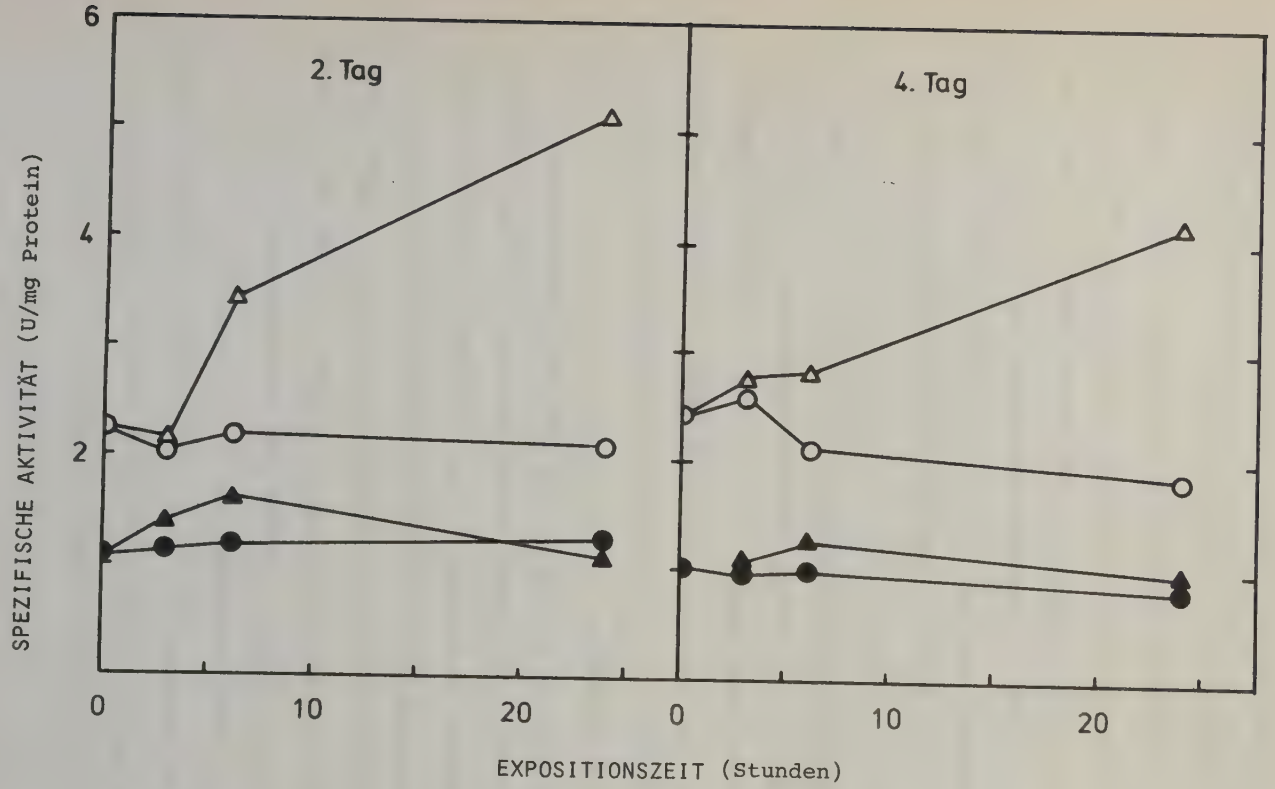


Abb. 35: Einfluß von Glucagon auf den zeitlichen Verlauf der Arginaseaktivität in perifundierten (offene Symbole) und diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten (geschlossene Symbole).
Kontrolle (○ , ●), Glucagon 10^{-6} M (△ , ▲)

dritten Kulturtag wurde im Mittel eine Steigerung um 80 % gemessen (5 Experimente). Der in Abb. 35 gezeigte Versuch wies die höchste gemessene Stimulierung auf. Offensichtlich geht das Ausmaß der Stimulierung mit zunehmender Kultivierungsdauer zurück; zwischen dem zweiten und dritten Kulturtag fanden sich jedoch stets nur unbedeutende Unterschiede.

3.3.2. Zeitabhängigkeit der Wirkungen von Glucagon und Dexamethason

Eingehendere Untersuchungen sowohl der Glucagonwirkung als auch der unterschiedlichen Ausprägung in den beiden Kultursystemen wurden unter Einbeziehung der übrigen Enzyme des Harnstoffzyklus durchgeführt. Neben einer Charakterisierung der Hormonantwort auch bei den restlichen Enzymen sollte vor allem geprüft werden, ob der Glucagoneffekt durch andere Hormone beeinflußt werden kann, da in einem solchen Fall das perifundierte System, infolge der stetigen Zufuhr von frischem Serum (enthält Hormone), begünstigt wäre.

Die Untersuchungen wurden in parallelen Experimenten an beiden Kultursystemen unter möglichst identischen Bedingungen durchgeführt. Der Aktivitätsverlauf der Harnstoffzyklusenzyme wurde über 24 Stunden nach Hormonzugabe während des dritten Kulturtages gemessen. Die Ergebnisse sind nachstehend getrennt aufgeführt.

a.) Perifundiertes System

Die Durchführung der Perifusion der insgesamt vier Kulturkammern erfolgte gemäß der allgemeinen Beschreibung 2.6.3.4. Nach der Aufsplitterung der Kammern in jeweils unabhängige, offene Perifusionssysteme wurden die Hormone bis zur gewünschten Endkonzentration den Medien zugesetzt, bzw. eine Kammer als Kontrolle gefahren.

Die Anwesenheit von Glucagon führte bei allen Harnstoffzyklusenzymen außer der Ornithin Transcarbamoylase zu einer gut meßbaren Stimulation der spezifischen Aktivität (Abb. 36 a - e). Diese Zunahme schien im wesentlichen innerhalb der ersten 10 Stunden nach Hormongabe beendet zu sein, lediglich bei der Arginase wurde ein eher kontinuierlicher Aktivitätsanstieg bis zum Ende der Inkubation beobachtet.

Die gleichzeitige Einwirkung von Glucagon und Dexamethason führte bei fast allen Enzymen zu einer wesentlich stärkeren Stimulation. Insbesondere bei der Carbamoylphosphat Synthase, der Argininosuccinat Synthetase und der Argininosuccinat Lyase konnte ein mehrfaches an Aktivitätszunahme gemessen werden. Der Aktivitätsverlauf der Arginase hingegen wurde nur geringfügig verändert. In Gegenwart beider Hormone setzte sich der Anstieg der spezifischen Aktivität nicht nur bei der Aginase, sondern auch bei der Carbamoylphosphat Synthase und der Argininosuccinat Synthetase über die gesamten 24 Stunden des Inkubationszeitraums hinweg fort. Ein Versuch, der sich über 48 Stunden erstreckte, führte zu dem Ergebnis, daß ein konstanter Aktivi-

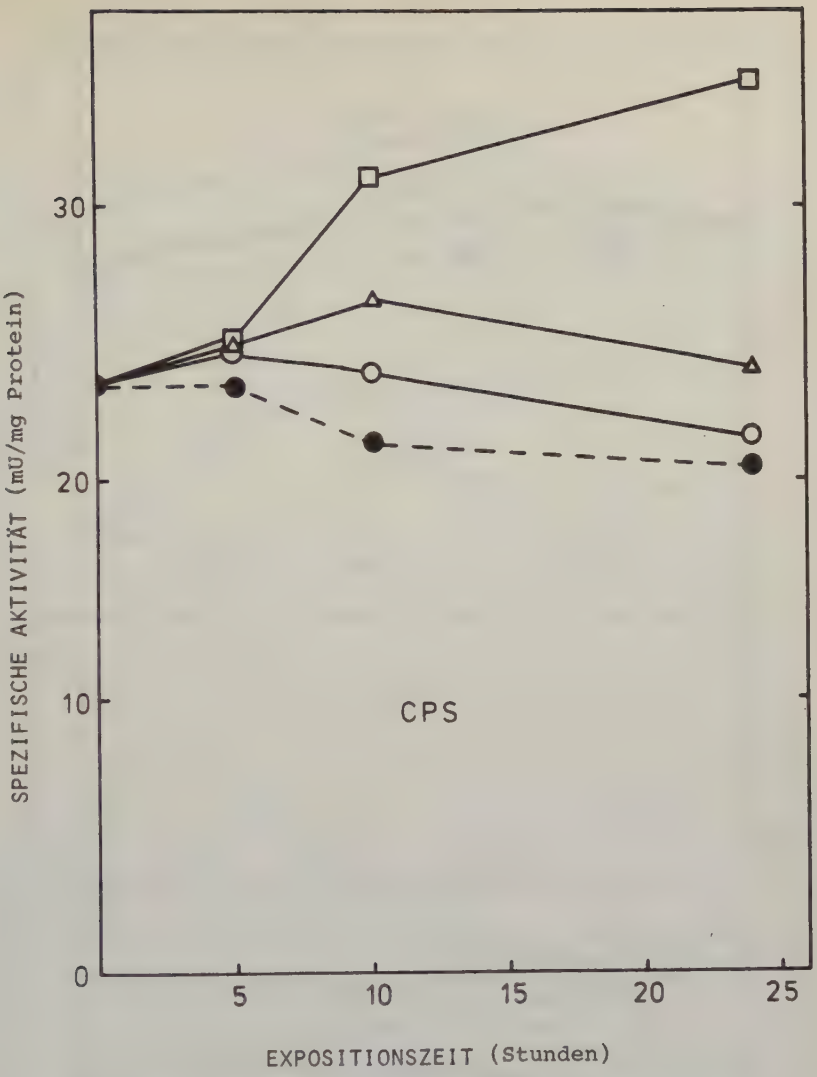
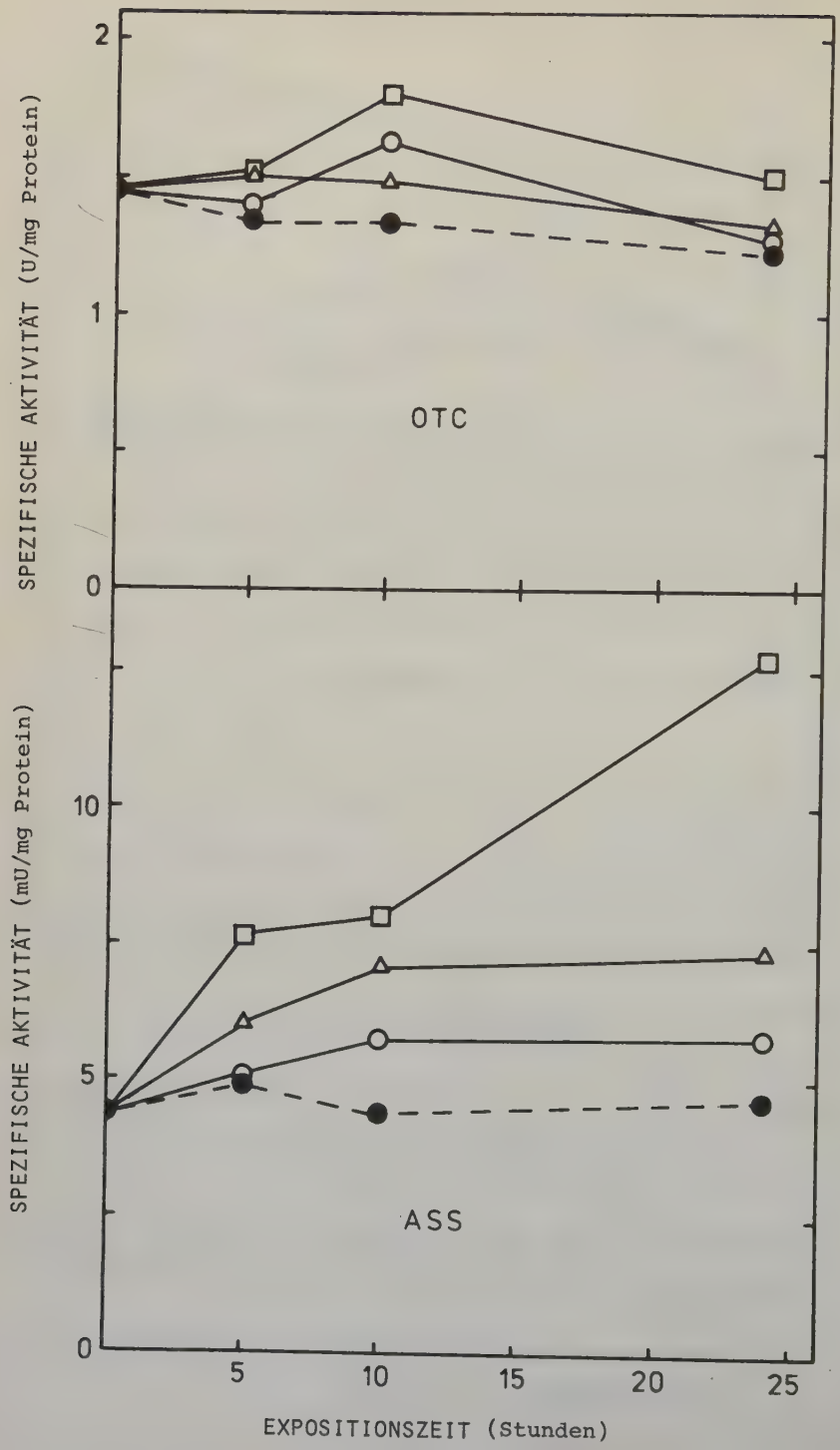


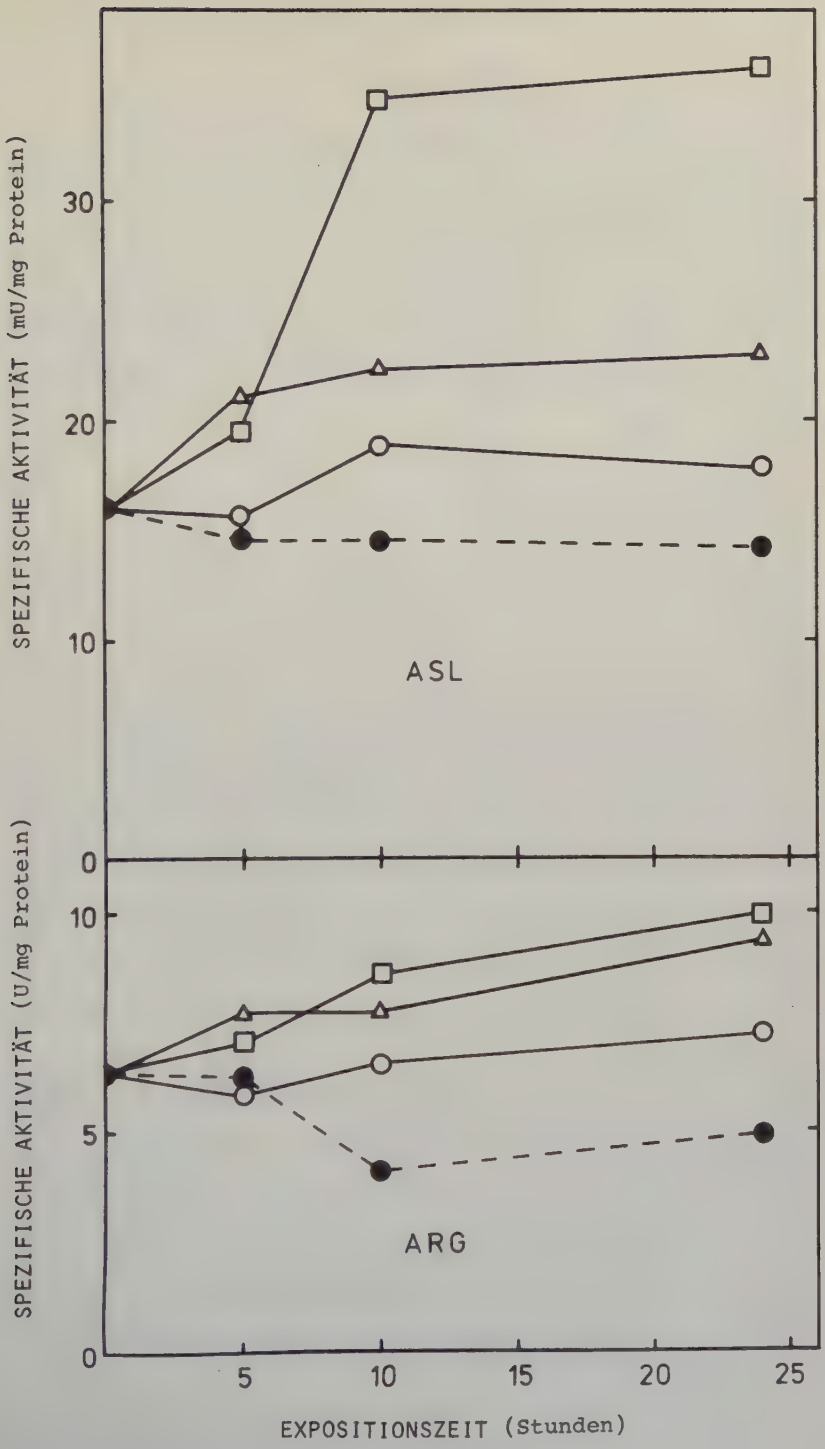
Abb. 36: Einfluß von Glucagon, Dexamethason und der Kombination beider Hormone auf den zeitlichen Verlauf der fünf Enzyme des Harnstoffzyklus in perifundierten Hepatozyten.

Kontrolle (●---●), Glucagon 10^{-6} M (△——△), Dexamethason 10^{-7} M (○——○), Glucagon und Dexamethason (□——□).

Beginn der Hormoninfusion: 45 h nach Absetzen der Kultur.

(Fortsetzungen der Abbildung S. 152 und 153)


SPEZIFISCHE AKTIVITÄT (U/mg Protein)
2
1
0
OTC
SPEZIFISCHE AKTIVITÄT (mU/mg Protein)
10
5
0
ASS
5
10
15
20
25
EXPOSITIONSZEIT (Stunden)


SPEZIFISCHE AKTIVITÄT (mU/mg Protein)
30
20
10
0
ASL
SPEZIFISCHE AKTIVITÄT (U/mg Protein)
10
5
0
ARG
5
10
15
20
25
EXPOSITIONSZEIT (Stunden)

tätsspiegel bei diesen Enzymen zwischen 24 und 35 Stunden erreicht wurde, der bei der Carbamoylphosphat Synthase nahezu doppelt, bei der Argininosuccinat Synthetase mehr als dreifach und bei der Arginase über doppelt so hoch lag wie bei unbehandelten Zellen. Dexamethason allein zeigte im allgemeinen keinen nennenswerten Einfluß. Nur bei der Argiginosuccinat Synthetase und der Arginase war ein kleiner, jedoch signifikanter Anstieg der Aktivität zu messen.

b) Diskontinuierliches System

Die Ergebnisse an diskontinuierlich kultivierten Zellen bestätigten den Befund mit der Arginase, wonach Glucagon in diesen Zellen keine Stimulation hervorzurufen vermag. Da dies für alle Harnstoffzyklusenzyme gilt, seien exemplarisch nur die Aktivitätsänderungen von Carbamoylphosphat Synthase (Abb. 37A) und Argininosuccinat Synthetase (Abb. 37B) dargestellt.

In Verbindung mit Dexamethason traten zwar bei einigen Enzymen (s. unten) gewisse Steigerungen der spezifischen Aktivität auf, insbesondere auch bei der Argininosuccinat Synthetase (Abb. 37B), jedoch blieben diese weit hinter den im perifundierten System gemessenen zurück.

Allgemein ist bei der diskontinuierlichen Kultur zu beachten, daß die Enzymspiegel der Kontrollkulturen entweder deutlich niedriger liegen als in der Perifusion (vgl. auch Abschnitt 3.1.4.1.), oder sich in einer Phase starker Veränderung befinden (s. z.B. Carbamoylphosphat Synthase, Abb. 37A). Solche Adaptionsvorgänge erschweren zweifellos die genaue Bestimmung der Hormonwirkung.

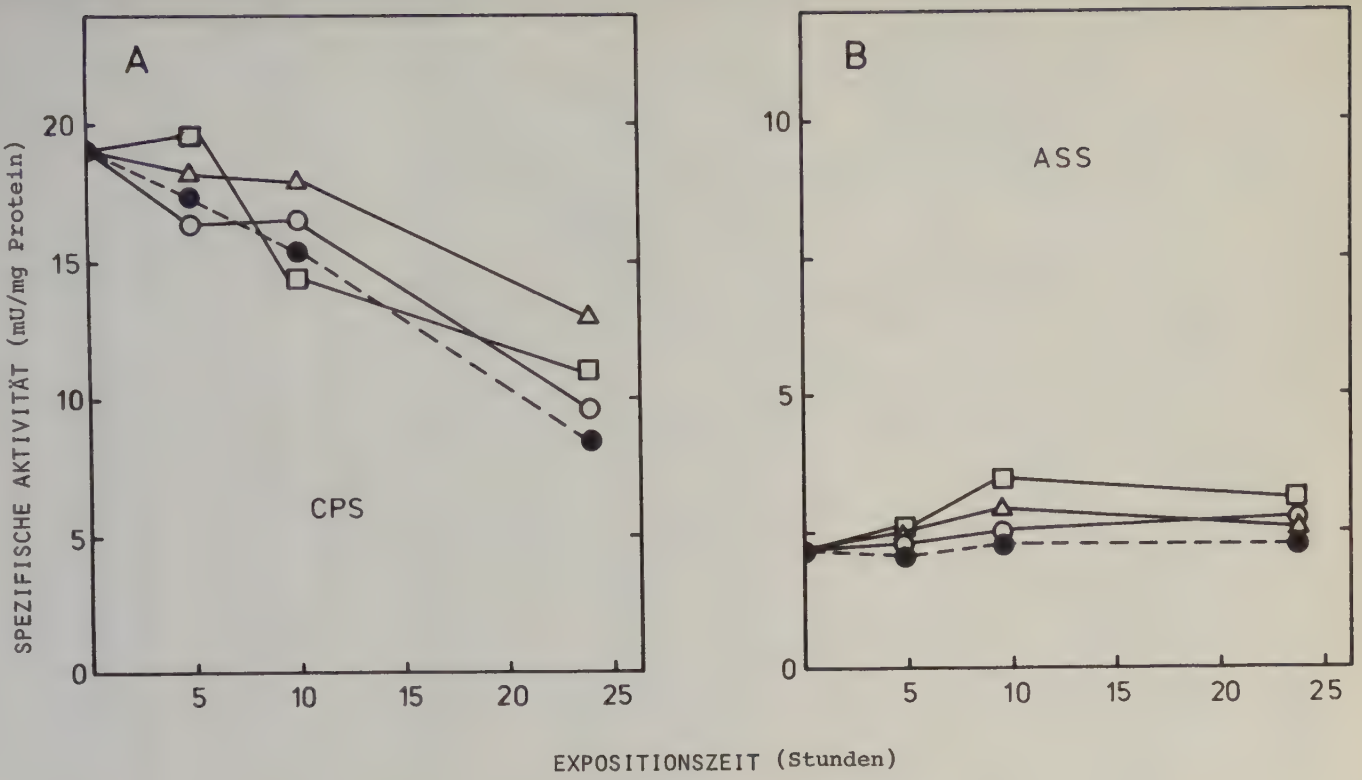


Abb. 37: Hormonwirkungen auf den zeitlichen Verlauf der Aktivitäten der Carbamoylphosphat Synthase (A) und der Argininosuccinat Synthetase (B) in diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten.

Kontrolle (●), Glucagon (△), Dexamethason (○), Glucagon und Dexamethason (□). Hormonkonzentrationen und weitere Einzelheiten s. Abb. 36.

Zur Kontrolle der verschiedenen Hormonwirkungen wurde die Aktivität der Tyrosin Aminotransferase in denselben Zellen gemessen. Aus Abb. 38 ist zu entnehmen, daß sowohl Glucagon, als auch Dexamethason die erwartete Wirkung zeigen. In Gegenwart beider Hormone zeigt sich eine Addition beider Wirkungen (eine Über-Additivität ist nicht auszuschließen). Diese Befunde stimmen gut mit den bekannten Hormonwirkungen auf die TAT überein (91, 394) und bestätigen zugleich, daß die kultivierten Hepatozyten eine einwandfreie Reaktion auf die Hormone zeigen können.

c) Vergleich der Kultursysteme

Eine zusammenfassende Gegenüberstellung der Wirkungen von Glucagon, Dexamethason und deren Kombination ist in Abb. 39 gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 - 4 Versuchen. Die Aktivitäten der Harnstoffzyklusenzyme wurden hier jeweils 24 Stunden nach Zugabe der Hormone, d.h. zu Beginn des vierten Kulturtages gemessen.

Aus dieser Gegenüberstellung werden nochmals die Unterschiede in der Hormonantwort im diskontinuierlichen und im perifundierten System deutlich.

Bemerkenswert ist außerdem, daß die Hormone besonders die zytoplasmatischen Enzyme stimulieren. Dies gilt auch für Dexa-

---

Bemerkung: Auf Grund der eindeutigen und gut meßbaren Hormonwirkungen in der Perifusion wurden die nachstehenden Untersuchungen zur Wirkungsweise dieser Hormone nur noch mit diesem Kultursystem durchgeführt.

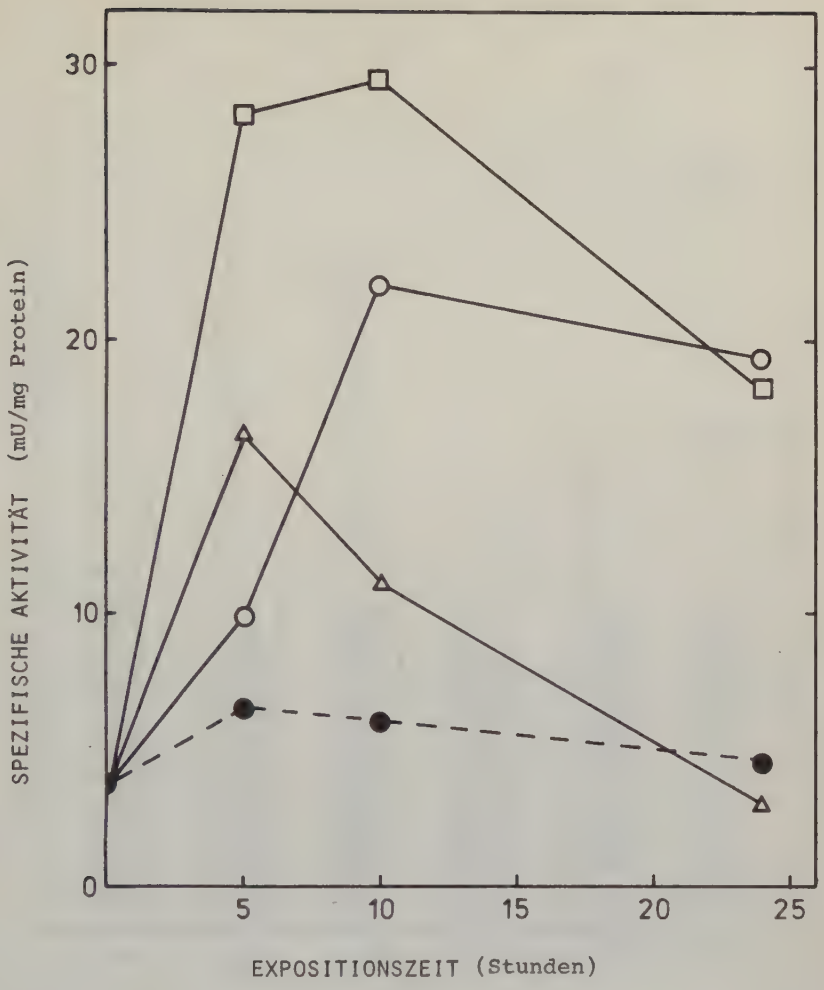


Abb. 38: Hormonwirkungen auf den zeitlichen Verlauf der Tyrosin Aminotransferase in diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten.

Kontrolle (●---●), Glucagon (△—△), Dexamethason (○—○), Glucagon und Dexamethason (□—□). Hormonkonzentrationen und weitere Einzelheiten s. Abb. 36

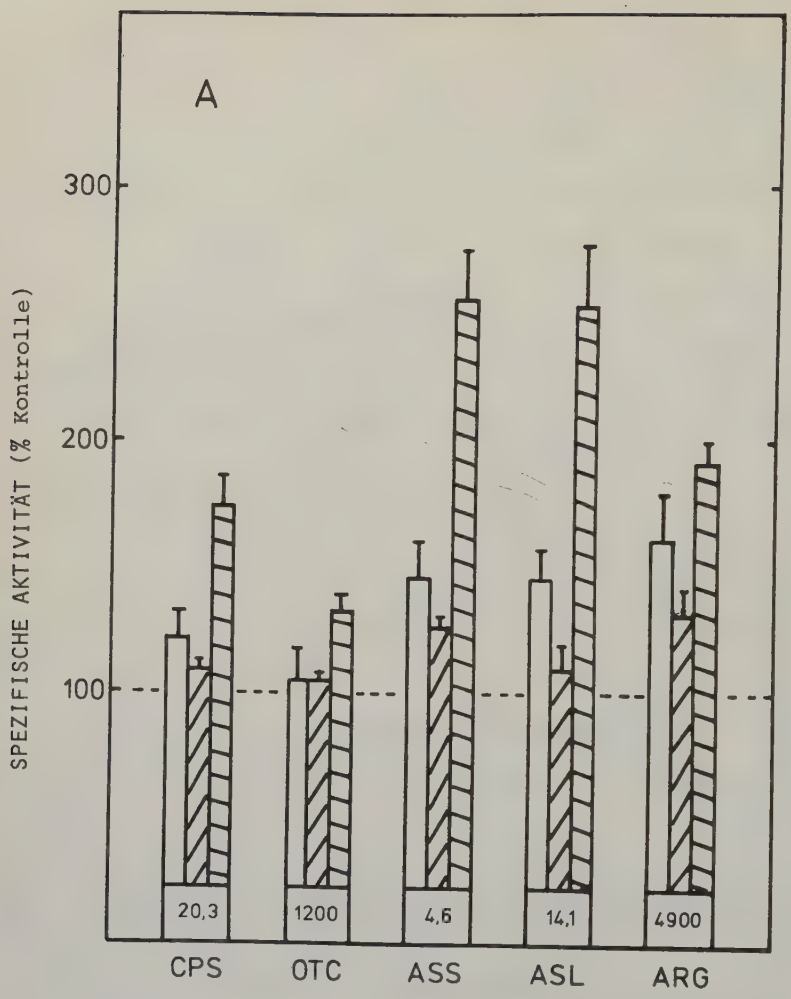


Abb. 39: Vergleich der Hormonwirkungen auf die fünf Enzyme des Harnstoffzyklus in perifundierten (A) und diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten (B).
Glucagon 10^{-6} M (□), Dexamethason 10^{-7} M (▨), Glucagon und Dexamethason (▣).
Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 - 4 Versuchen.
(Die Werte an der Basis der Säulen geben die spezifische Aktivität der Enzyme in den Kontrollkulturen an.)

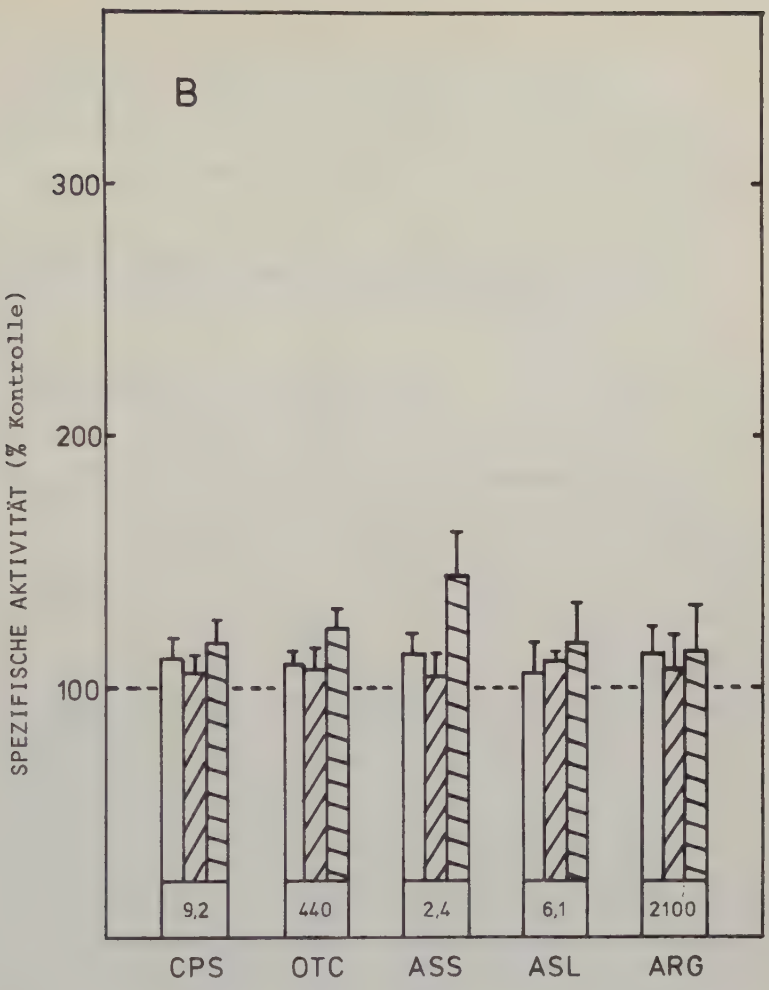

B
300
200
100
SPEZIFISCHE AKTIVITÄT (% Kontrolle)
9,2
440
2,4
6,1
2100
CPS
OTC
ASS
ASL
ARG

Abb. 39B

methason, wenn dieses allein gegeben wird. Es steht zu vermuten, daß dieser Effekt durch die Wirkung anderer Hormone (wahrscheinlich Glucagon) aus dem Serum hervorgerufen wird.

3.3.3. Einfluß der Präperifusion mit Dexamethason auf die Glucagonwirkung

Um einen Einblick in das Zusammenwirken von Glucagon und Dexamethason zu erhalten, wurde der Einfluß einer Vorinkubation der Zellen mit Dexamethason auf die Glucagonstimulierung der Harnstoffzyklusenzyme untersucht.

Der Versuch wurde wie unter 2.6.3.5. beschrieben durchgeführt. Obwohl das Medium in der Kulturkammer nach Abschluß der Präperifusion nicht gewechselt wurde, kann angenommen werden, daß wirksame Konzentrationen von Dexamethason nur während einer kurzen Zeitspanne zu Beginn der Perifusion mit Glucagon vorhanden waren, da die offene Perifusion einen raschen Austausch des Mediums bewirkt.

Wie aus Tabelle 15 ersichtlich, führt die Vorbehandlung der Hepatocyten mit Dexamethason zu einer Steigerung der Glucagonwirkung innerhalb von 20 Stunden, die derjenigen einer gleichzeitigen Einwirkung von Glucagon und Dexamethason voll vergleichbar ist.

Serie	Hormon	Spezifische Aktivität (mU/mg Protein)				
		CPS	OTC	ASS	ASL	ARG
A	Kontrolle	21.4	1300	4.3	14.6	4200
	Glucagon	26.5	1500	7.0	22.8	7700
	Dexamethason	23.0	1600	5.8	17.6	6600
	Glucagon + Dexamethason	31.1	1800	8.1	34.3	8200
B	Kontrolle	19.3	1000	3.8	11.1	3900
	Glucagon	25.4	1100	4.7	17.2	6600
	Glucagon (nach Perifusion mit Dexamethason für 6 Stunden)	35.1	1700	11.6	30.5	8700

Tabelle 15: Einfluß einer Vorinkubation mit Dexamethason auf die Stimulation der Harnstoffzyklusenzyme mit Glucagon.

Hormonkonzentration: Glucagon 10^{-6} M, Dexamethason 10^{-7} M (bei Vorinkubation 10^{-6} M)

Expositionszeit: Serie A 10 Stunden; Serie B 20 Stunden

(Beginn: 40 Stunden nach Start der Perifusion)

3.3.4. Abhängigkeit der Stimulation von der Glucagonkonzentration

Der Einfluß der Glucagonkonzentration wurde nur in Gegenwart von Dexamethason und nur an den Enzymen Argininosuccinat Synthetase und -Lyase untersucht, da hier die größte Variationsbreite vorhanden war.

Als Bezugswert (100 %) diente die Stimulation, die unter Standardbedingungen mit 10^{-6} M Glucagon und 10^{-7} M Dexamethason gemessen wurde. Tabelle 16 zeigt, daß bis zu einer Konzentration von 5×10^{-9} M die Glucagonwirkung fast ungeschmälert war.

Konzentration (M)	Stimulation (%)	
	ASS	ASL
10^{-6}	100	100
10^{-8}	98	112
5×10^{-9}	94	97
10^{-9}	73	66

Tabelle 16: Abhängigkeit der Stimulation von Argininosuccinat Synthetase und -Lyase von der Konzentration des Glucagons in einem Gemisch mit Dexamethason.

Konzentration des Dexamethasons 10^{-7} M
(die Stimulation bei 10^{-6} M Glucagon wurde als Bezugswert gleich 100 % gesetzt)
Expositionszeit: 24 h
(Beginn: 46 h nach Absetzen der Kultur)

3.3.5. Einfluß von Cycloheximid

Ein erster Hinweis darauf, ob die beobachtete Stimulierung der Harnstoffzyklusenzyme auf einer Neusynthese von Enzymproteinen beruht, sollte durch Anwendung von Cycoheximid erhalten werden.

Gemessen wurden hierfür die drei Enzyme Carbamoylphosphat Synthase, Argininosuccinat Synthetase und Arginase. Der Versuchsaufbau entsprach den Bedingungen der vorstehenden Versuche mit der Ausnahme, daß 8 Kammern gleichzeitig verwendet wurden und die Hälfte hiervon zusätzlich mit Cycloheximid infundiert wurde.

In Anwesenheit des Proteinsyntheseinhibitors war die Stimulation bei allen Enzymen unterbunden (Tabelle 17). Im Vergleich zur Kontrollkultur führte Cycloheximid allein zu einer gewissen Verringerung der Enzymspiegel.

Diese Befunde machen es wahrscheinlich, daß Glucagon eine echte Induktion der Harnstoffzyklusenzyme bewirkt.

3.3.6. Einfluß von Dibutyryl-cAMP

Nach heute gültigen Vorstellungen wird die Wirkung von Glucagon auf die Induktion verschiedener Enzyme durch cAMP als "second messenger" vermittelt (42, 94). Es sollte daher durch Anwendung von Dibutyryl-cAMP geprüft werden, ob dies auch im vorliegenden Fall angenommen werden kann.

Das Ergebnis einer 24-stündigen Perifusion in Gegenwart von Bt_2-cAMP während des dritten Kulturtages ist in Tabelle 17 zu-

Serie	Behandlung	Spezifische Aktivität (mU/mg Protein)		
		CPS	ASS	ARG
I	Kontrolle	19.4 (18.1-20.7)	4.6 (4.1-4.8)	4900 (3400-5700)
	Glucagon	23.9 (22.9-24.2)	7.1 (6.3-8.2)	9300 (8600-9900)
	Dexamethason	21.9 (21.2-22.8)	5.4 (5.1-6.3)	7300 (6900-8100)
	Glucagon + Dexamethason	33.3 (31.8-34.1)	12.1 (11.5-12.7)	10400 (9700-10900)
	Cycloheximid	16.5 (15.8-16.7)	3.1 (2.8-3.3)	4700 (3100-4900)
	Glucagon + Cycloheximid	16.1 (15.6-16.5)	3.3 (2.8-3.7)	4200 (3700-4600)
	Dexamethason + Cycloheximid	15.8 (15.3-16.2)	3.0 (2.5-3.3)	4500 (3900-4300)
	Glucagon + Dexamethason + Cycloheximid	17.3 (16.8-17.7)	3.2 (2.9-3.8)	3900 (3600-4900)
II	Kontrolle	17.5 (16.7-19.9)	2.9 (2.5-3.1)	3700 (3100-4200)
	Dibutyryl-cAMP	18.7 (18.3-19.1)	4.4 (4.1-4.6)	4100 (3900-4400)
	Dibutyryl-cAMP + Dexamethason	27.7 (27.2-27.9)	10.2 (10.0-10.5)	8300 (7800-8600)
	Dibutyryl-cAMP + Dexamethason + Cycloheximid	16.1 (15.3-16.8)	2.2 (1.7-2.8)	3800 (2100-4000)

Tabelle 17: Einfluß von Cycloheximid auf die hormonell und Dibutyryl-cAMP-induzierte Stimulation einiger Harnstoffzyklusenzyme.

Konzentrationen: Glucagon 10^{-7} M, Dexamethason 10^{-8} M, Cycloheximid $3{,}5 \times 10^{-5}$ M, Dibutyryl-cAMP 2×10^{-5} M.

Expositionszeit: 24 Stunden

(Beginn: 40 Stunden nach Start der Perifusion)

(Angegeben sind die Mittelwerte von vier Bestimmungen; der Bereich der Einzelwerte ist in Klammern angeführt)

sammengestellt. Der Versuch zeigt deutlich, daß Glucagon, hinsichtlich dessen Induktion dreier Harnstoffzyklusenzyme, durch Bt_2-cAMP gleichwertig ersetzt werden kann. Die Aktivitätssteigerung ist insbesondere in Gegenwart von Dexamethason kaum von der mit Glucagon verschieden. Die Einwirkung von Bt_2-cAMP zusammen mit Glucagon, die in einem zusätzlichen Experiment untersucht wurde, erbrachte keine Steigerung der Wirkung von Glucagon allein. Auf Grund dieser Ergebnisse kann somit weitgehend ausgeschlossen werden, daß der potenzierende Einfluß von Dexamethason auf die Glucagonwirkung über eine gesteigerte Bildung von cAMP zustande kommt. Aus Tabelle 17 ist ferner zu entnehmen, daß auch die Wirkung von cAMP durch Cycloheximid aufgehoben werden kann.

3.3.7. Einfluß von Adrenalin auf die Harnstoffzyklusenzyme

Da auch Adrenalin - über seine Wechselwirkung, mit ß-adrenergen Rezeptoren der Leberzellen (93, 286) - den cAMP-Spiegel der Zellen zu erhöhen vermag, wurde untersucht, ob Glucagon auch durch Adrenalin ersetzt werden kann.

Tabelle 18 zeigt das Ergebnis einer 10-stündigen Infusion von Adrenalin allein, als auch in Verbindung mit Dexamethason nach 40 Stunden Kultivierung in geschlossener Perifusion. Im Vergleich zu Glucagon führte Adrenalin innerhalb der Inkubationszeit zu keiner nennenswerten Stimulation der Aktivitäten der Harnstoffzyklusenzyme, woran auch die Anwesenheit von Dexamethason nur wenig änderte. Eine Verängerung der Inkubationszeit

Hormon	Spezifische Aktivität (mU/mg Protein)				
	CPS	OTC	ASS	ASL	ARG
Kontrolle	20.1	1100	3.7	10.9	4000
Adrenalin	19.7	1200	4.0	11.8	4200
Adrenalin + Dexamethason	22.3	800	4.4	12.4	4500

Tabelle 18: Einfluß von Adrenalin auf die Aktivität der Harnstoffzyklusenzyme

Konzentrationen: Adrenalin 10^{-6} M, Dexamethason 10^{-7} M.

Expositionszeit: 10 Stunden

(Beginn: 40 Stunden nach Start der Perifusion)

hatte ebenfalls keine signifikante Steigerung der Enzymaktivitäten zur Folge.

3.3.8. Abhängigkeit der Hormonwirkung vom Kulturmedium und der Leucinkonzentration

Während einiger Versuche (s. Abschn. 3.1.3.2.) zur Beeinflussung der basalen Harnstoffsynthese durch Leucin waren erste Hinweise erhalten worden, die eine Interferenz des Leucins auch mit der Stimulation der Arginase durch Glucagon nahelegten. Da außerdem die Art des Kulturmediums von Bedeutung zu sein schien, sollten diese Einflüsse einer genaueren Prüfung unterzogen werden.

Hierzu wurden Hepatozyten mit L-15 oder W/AB 77-Medium für einen, drei oder sieben Tage perifundiert. Danach wurde die gewünschte Leucinkonzentration in den Medien eingestellt und mit oder ohne Glucagon (10^{-7} M) für weitere 24 Stunden im offenen System perifundiert.

Die Arginaseaktivitäten von 2 - 3 Bestimmungen sind zusammen mit dem prozentualen Anstieg gegenüber der Kontrolle in Tabelle 19 zusammengefaßt. Offenbar nimmt die Glucagonwirkung im L-15 Medium schneller ab, als in W/AB 77-Medium. Gleichzeitig scheint die Hemmung der Glucagonwirkung durch Leucin ebenfalls in L-15 etwas schwächer auszufallen.

In beiden Medien geht die Hemmung mit zunehmender Kultivierungsdauer immer mehr zurück. Dies gilt auch für die hohe Konzentration von 10 mM Leucin, die zu Beginn der Kultivierung zu einer völligen Aufhebung der Glucagonwirkung führt.

Medium	Behandlung	Spezifische Aktivität (U/mg Protein)					
		2. Tag		4. Tag		8. Tag	
			% Zunahme		% Zunahme		% Zunahme
L 15	Kontrolle	5.2 (4.8- 5.3)		3.8 (3.6- 4.1)		3.6 (3.2- 3.7)	
	Glucagon	8.5 (7.9- 9.4)	63	5.4 (5.0- 5.9)	42	4.3 (4.0- 4.5)	19
	Glucagon + Leucin(5mM)	7.5 (7.2- 7.6)	44	4.9 (4.4- 5.2)	29	3.8 (3.6- 4.1)	6
W/AB 77	Kontrolle	6.3 (5.7- 6.5)		6.5 (4.9- 5.9)		4.6 (3.9- 4.8)	
	Glucagon	11.8(11.2-12.3)	87	9.9 (9.3-10.7)	52	7.2 (7.0- 7.6)	56
	Glucagon + Leucin(5mM)	8.7 (8.3- 9.0)	38	7.3 (6.8- 7.4)	12	6.6 (6.3- 6.8)	43
	Glucagon + Leucin (10mM)	6.2 (5.9- 6.5)	0	6.8 (6.2- 7.1)	5	5.9 (5.7- 6.3)	28

Tabelle 19: Einfluß des Kulturmediums und von Leucin auf die Stimulation der Arginase durch Glucagon in perifundierten Hepatocyten.

Konzentrationen: Glucagon (10^{-7} M)

Inkubationszeit: 24 Stunden

(Angegeben sind die Mittelwerte von zwei oder drei Bestimmungen)

4. DISKUSSION

4.1. Die Kultivierung von Hepatozyten

4.1.1. Morphologische Entwicklung der Hepatozytenkultur

Eine erste Bewertung der Güte von Zellkulturen ist an Hand des lichtmikroskopischen Erscheinungsbildes möglich, da sich Störungen der Kulturbedingungen häufig in mehr oder weniger starken Abweichungen von der normalen Entwicklung bemerkbar machen. Die in Abschnitt 3.1.1. beschriebenen typischen Veränderungen der Zellmorphologie, die im Laufe der Kultivierung auftreten, sollen eine Grundlage für eine derartige Beurteilung abgeben und darüber hinaus einen Vergleich mit den Befunden anderer Autoren ermöglichen.

Auf Grund der hier gemachten Beobachtungen läßt sich zunächst allgemein feststellen, daß sich die Entwicklung der Hepatozytenkultur aus zunächst einzelnen Zellen zu einer vollständigen Monolayer ganz analog zu der anderer Zellarten vollzieht, die ursprünglich einem epithelialen Gewebsverband angehört haben (398). Ferner decken sich diese Abläufe weitgehend mit den Befunden, die für Primärkulturen von Leberparenchymzellen von verschiedenen Laboratorien beschrieben wurden (35, 39, 241, 388). Sofern hier Unterschiede sichtbar sind, betreffen sie im wesentlichen die zeitliche Abfolge des Geschehens und scheinen in den abweichenden Kulturbedingungen begründet. (Auf den Einfluß der Kulturbedingungen wird an späterer Stelle eingegangen: 4.1.4.).

Auch der lichtmikroskopische Vergleich zwischen der Entwicklung der Monolayer-Kultur im diskontinuierlichen und im perifundierten System läßt Unterschiede vor allem in der Geschwindigkeit erkennen, mit der sich die Ausbildung des epithelialen Zellrasens vollzieht, und weniger hinsichtlich der Art der Abfolge oder der dabei auftretenden charakteristischen Stadien. So erscheint denn auch der auffallendste Kontrast - die langfristige Erhaltung eines vitalen Zellverbandes in der Perifusion - eher als eine Dehnung eines prinzipiell gleichartigen Ablaufs, denn als Einmündung in einen Zustand qualitativ andersartiger struktureller und funktioneller Integrität.

Der Ablauf der morphologischen Entwicklung selbst läßt sich mit Hilfe des Lichtmikroskops naturgemäß nur relativ grob erfassen und kann infolgedessen nur in wenige Stadien eingeteilt werden, die deutlich voneinander trennbar sind. Die Vielzahl feinerer morphologischer Veränderungen sowohl der Plasmamembran als auch der Zellkompartimente, die diesem Geschehen zugrunde liegen, wird erst durch Einsatz von Transmissions- und Scanning-Elektronenmikroskopie zugänglich. In jüngster Zeit wurden verschiedene detaillierte Studien veröffentlicht (63, 247, 316, 388), in denen die Ausbildung der Hepatozyten-Monolayer unter Anwendung dieser Techniken näher charakterisiert wurde. Im folgenden soll nun versucht werden, diese Befunde zu den hier gemachten lichtmikroskopischen Beobachtungen in Beziehung zu setzen, um auf diese Weise eine umfassendere Beschreibung der morphologischen Entwicklungsvorgänge bei Primär-

kulturen von Hepatozyten geben zu können.

Nach elektronenoptischen Aufnahmen sind frisch isolierte, noch kugelige Hepatozyten ringsum dicht mit Mikrovilli besetzt (26, 30). Diese werden offenbar zu einem Großteil eingeschmolzen, wenn sich die Zellen anheften und ausbreiten, da in diesem Stadium größere Areale der Zelloberfläche im SEM-Bild relativ glatt erscheinen (7, 247). Erst nachdem die Ausbildung von Zell-Trabeculi abgeschlossen ist, ist die gesamte, dem Medium zugekehrte Fläche wieder lückenlos mit Mikrovilli besetzt.

Neben dieser Reduktion der mikrovillösen Strukturen geht mit dem Ausbreiten der Hepatozyten auch die Bildung dünner Lamellen an der Basis der noch einzeln liegenden Zellen einher. Möglicherweise werden durch diesen Vorgang die charakteristischen Beugungserscheinungen hervorgerufen, die im Phasenkontrast die aktive Adaptation der Hepatozyten begleiten. Zusätzlich weisen die Zellen in diesem Stadium langgestreckte, philopodienähnliche Fortsätze auf, die mehrere µm lang sein können und bei der Aggregation der Zellen beteiligt scheinen (247). Offenbar sind solche Strukturen jedoch nur selten mit der Anheftung an das Substratum verbunden, die bevorzugt über Mikrovilli erfolgt.

Im Anschluß an die Ausbildung von Zell-Trabeculi und kleineren Inseln zeigen besonders die randständigen Zellen lamellare Fortsätze, die sich später als Lamellipodien ausformen können und auch im Lichtmikroskop deutlich zu sehen sind. Wie durch Immunfluoreszenz gezeigt werden konnte (247),lagert sich in diesen Strukturen das zunächst - im isolierten Hepatozyten -

diffus verteilte Aktin erstmals zu größeren Aktin-Fasern zusammen. Von verschiedenen Autoren wurde ferner beschrieben, daß zum gleichen Zeitpunkt auch Mikrofilamentbündel in größerer Zahl an der apikalen Seite der Hepatozyten parallel zur Plasmamembran auftreten (63, 316). Diese Anhäufung wurde besonders nach Zusatz von Glucocorticoiden beobachtet (127).

Sowohl die peripheren Aktin-Fasern, als auch die apikalen Mikrofilamente scheinen in Zonen mit intensiver Zellhaftung angereichert. So wurde vermutet, daß sich epitheliale Zellrasen besonders an den randständigen Zellen an das Substratum anheften, während die zentral gelegenen Zellen vor allem durch Kontakte untereinander gehalten werden (87, 382). Die Bündel dürften ferner als ein Zeichen für isometrische Kontraktion in den Hepatozyten angesehen werden (1, 97), wodurch eine Spannung innerhalb des Zellrasens entsteht. Diese Spannung könnte die Ursache für das Zusammenziehen der Zellmonolayer bei Verwendung eines halbfesten Substratums wie der schwimmenden Kollagen-Gele (241) sein, das auch bei festen Trägern nach einem teilweisen Ablösen der Zellen auftreten kann (382). Möglicherweise ist die Kontraktion von Zellinseln und Trabeculi, die bei den hier beschriebenen Kulturen, insbesondere bei diskontinuierlicher Kultivierung beobachtet werden konnte, auf ein Nachgeben randständiger Zellen gegenüber derartigen Spannungen zurückzuführen. Die Verzögerung dieses Vorgangs im Vergleich zu Kulturen auf Kollagen-Gelen könnte davon herrühren, daß eine teilweise Ablösung vom festen Substratum erst zu einem späteren Zeitpunkt eintritt.

Nach ungefähr einem Tag in Kultur sind im elektronenoptischen Bild bereits wieder morphologische Differenzierungen der Zellmembran zu erkennen, die der interzellulären Kommunikation dienen. Hierzu gehören die verschiedenen Desmosomen (macula densa), die 'gap-' (zonula occludens) und 'tight-junctions' (zonula adhaerens), sowie die Gallekanälchen. Diese Strukturen, die an isolierten Hepatozyten nicht mehr in der Plasmamembran nachgewiesen werden können, werden vermutlich im Laufe der Zellisolation in Autophagosomen aufgenommen und abgebaut (30, 31). Bei unvollständig getrennten Zellkomplexen können sie jedoch erhalten bleiben und werden auf diese Weise in die Kultur eingebracht. Es besteht jedoch kein Zweifel daran, daß solche organtypischen Differenzierungen in der Kultur de novo gebildet werden (9, 63, 316, 388).

Besonders eindrucksvoll wurde dies von Drochmans und Mitarbeitern (388) für zelluläre Membrandifferenzierungen mit den strukturellen Eigenschaften von Gallekanälchen gezeigt. Die Autoren konnten dabei verschiedene Stadien der Entwicklung neuer 'tight-junctions' in unmittelbarer Nähe der Gallekanälchen zwischen aneinandergrenzenden Hepatozyten unterscheiden (388).

Hinsichtlich der individuellen Ausprägung der Gallekanälchen besteht jedoch einige Unklarkeit. So wurde von Wanson et al. (388) nicht nur die Anwesenheit zahlreicher Mikrovilli im Lumen hervorgehoben, sondern auch eine charakteristische Orientierung des Golgi-Apparates in Richtung auf diese Gallekanälchen, wie sie in der adulten Leber vorliegt (49, 266). Demgegenüber be-

schrieben Sattler et al. (316) gallekanälchenartige Strukturen, die nur wenige Mikrovilli aufwiesen und damit dem Typ 3 nach der Definition von De Wolf-Peters und Desmet (84) entsprechen, der in der Leber bevorzugt kurz vor und nach der Geburt eines Tieres auftritt. Diese Ausprägung der Gallekanälchen deutet auf eine bestehende Cholestase hin, womit sich auch das Auftreten stark dilatierter Kanälchen erklären ließe. Solche Gallekanälchen, die lichtmikroskopisch sichtbar sind, wurden von Kulturen foetaler Leberzellen beschrieben (190, 307). Sie zeigen die charakteristischen Merkmale derjenigen Strukturen, die auch in der vorliegenden Arbeit als Gallekanälchen angesprochen werden. Die Frage, ob der strukturellen Integrität dieser Strukturen ein funktionelles Korrelat zugeordnet werden kann, ist bislang unbeantwortet. Verschiedene indirekte Hinweise machen es jedoch sehr wahrscheinlich, daß die Gallekanälchen auch funktionell intakt sind und es zumindest in einem frühen Stadium der Kultur zu einer aktiven Sekretion kommt. Das oben vermutete Auftreten cholestatischer Phänomene könnte allerdings anzeigen, daß die Funktion bei längerfristiger Kultivierung gestört oder gar weitgehend unterbunden ist.

Etwas später als die Gallekanälchen, d.h. zwischen 24 und 48 Stunden, werden andere kommunikative Strukturen, die Desmosomen und 'gap-junctions' ausgebildet. Während darüber weitgehende Einigkeit herrscht (63, 247, 316, 388), daß diese Membrandifferenzierungen in den Hepatozytenkulturen verbreitet auftreten, ist es im Augenblick noch offen, ob die Hepatozyten ein zweites System von 'tight-junctions' nahe der dem Medium zuge-

kehrten Oberfläche der Zellen entwickeln. Hinweise darauf wurden von Sattler et al. (316) und Neupert (263) veröffentlicht. Von Wanson et al. (388) konnten diese Befunde allerdings nicht bestätigt werden.

Offensichtlich bieten somit die kultivierten Parenchymzellen nach einer Kultivierungsdauer von ca. zwei bis drei Tagen ein zumindest morphologisch weitgehendes Ebenbild der Leberparenchymzellen in vivo, mit all ihren besonderen Membrandifferenzierungen. Bei fortschreitender Kultivierung kommt es jedoch in zunehmendem Maße zu Veränderungen der Morphologie und der Feinstruktur der Zellen. So wurde von vielen Autoren eine Häufung von Lipidtröpfchen und Autophagosomen beschrieben (63, 316, 388). Letztere erscheinen oft leer, manche enthalten aber auch Zellbruchstücke, Membranen und Glykogenpartikel (388).

Über die Vorgänge, die schließlich zum Zelltod führen, ist augenblicklich wenig bekannt. Zwar sind die abgestorbenen Hepatozyten meist stark eosinophil, doch ist ein Zusammenhang mit entsprechenden Endstadien bei pathologischen Veränderungen des Lebergewebes bislang nicht nachgewiesen. Überhaupt fehlt es an Untersuchungen über Beziehungen zwischen den späten Entwicklungen in vitro und den verschiedenartigen nekrotischen Stadien (Milchglaszellen, 'Mallory Body', 'Biliary Body', etc.) in der Pathogenese der Leber, die möglichenfalls Hinweise auf die Ursachen des Zelltods bei längerwährender Kultivierung geben könnten. Ob die Autophagosomen, die sich im Endstadium der Kultur in den Zellen anhäufen, zur Nekrose der Hepatozyten beitragen, ist ebenfalls noch unklar.

4.1.2. Biochemische Entwicklung

Während die lichtmikroskopische Gegenüberstellung nur einen sehr groben Überblick über die Entwicklungsvorgänge der Hepatozytenkulturen zu liefern vermag, können diese an Hand der biochemischen Daten hinsichtlich der Unterschiede und Ähnlichkeiten in den verschiedenen Kultursystemen wesentlich umfassender und detaillierter charakterisiert werden.

Sowohl der Verlauf des Gesamtproteingehalts als auch der des DNS-Gehalts deuten darauf hin, daß sich in der Perifusion mehr Zellen an die *in vitro* Bedingungen adaptieren als in der diskontinuierlichen Kultur. Die beobachtete starke Reduzierung der frühen Zellnekrosen und die infolgedessen gesteigerte Absetzrate nach 24 Stunden in Perifusion dürften zu der oben erwähnten (4.1.1.) beschleunigten Ausbildung der Monolayer mit beitragen. Besonders auffällig in diesem Zusammenhang ist der Befund, daß die perifundierte Kultur weitgehend unempfindlich gegenüber einer Verringerung des Serumanteils im Kulturmedium auf ca. 2 % ist (vgl. 4.1.4.3.), während im diskontinuierlichen System ein ausgeprägter Verlust an zellulärem Material eintritt. Dieser Kontrast ist eine Folge der guten Resultate in der Perifusion, da die Befunde an der diskontinuierlichen Kultur bezüglich Gesamtprotein- und DNS-Gehalt gut mit entsprechenden Angaben aus der Literatur übereinstimmen (18, 40, 241, 317). Dies gilt ebenso für den Einfluß des Serumanteils (201).

Auch der Vergleich der Aktivitätsspiegel von Enzymen des

Stickstoffstoffwechsels weist die Perifusion als das adäquatere Kultursystem aus. So bleiben etwa die spezifischen Aktivitäten der Harnstoffzyklusenzyme wesentlich besser erhalten als in der diskontinuierlichen Kultur, wo die Ergebnisse wiederum gut mit den Befunden anderer Autoren übereinstimmen (201). Die Ursache für die größere Stabilisierung der gemessenen Parameter in der Perifusion dürfte in der verbesserten nutritiven Versorgung allgemein und speziell in der ständigen Anwesenheit von Hormonen zu suchen sein. Letztere ist dadurch gewährleistet, daß in der Perifusion stets mit serumhaltigem Medium gearbeitet werden muß, um ein Absterben der Zellen zu verhindern (vgl. 4.1.4.3.). Bei der diskontinuierlichen Kultur muß hingegen nicht nur mit einem raschen Abbau der im Serum vorhandenen Hormone gerechnet werden, sondern zusätzlich mit Veränderungen im Substratgehalt des Kulturmediums, die als Folge der Stoffwechselaktivität der kultivierten Hepatozyten auftreten. Wechselwirkungen dieser Art könnten dafür verantwortlich sein, daß sich Enzymaktivitäten anders verändern, als dies zu erwarten wäre, wenn die Enzyme, bei fehlender Induktion, ausschließlich einem unbeeinflußten Abbau unterliegen würden. Beispiel hierfür ist die Arginase, deren Halblebenszeit in vivo mit 4 bis 5 Tagen angegeben wurde (326), die jedoch in diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten bereits innerhalb von zwei Tagen die Hälfte ihrer Aktivität verliert. Dieses Ergebnis könnte auf eine beschleunigte Degradation des Enzyms infolge der sich verändernden Milieubedingungen hindeuten, obwohl die angegebene Halblebenszeit möglicherweise zu hoch ist (vgl. 3, 77). Eine ähnliche

Auswirkung schwankender extrazellulärer Metabolitkonzentrationen, wie sie nur im diskontinuierlichen System auftreten, wird im Zusammenhang mit der hormonellen Regulation von Arginase und Glutamin-Synthetase an anderer Stelle diskutiert (4.2.1. bzw. 4.2.2.).

Ähnliche Unterschiede zwischen den verschiedenartig kultivierten Hepatozyten, wie sie bei der Aufrechterhaltung von Enzymspiegeln gefunden wurden, konnten auch in bezug auf die Stoffwechseltätigkeit der Zellen an Hand der Syntheseleistung für Harnstoff und deren regulatorischer Eigenschaften festgestellt werden. Die Ureogenese kann dabei als komplexes Vitalitätskriterium angesehen werden, das Aussagen über die funktionelle Integrität der Hepatozyten ermöglicht und zugleich eine Grundlage für den Vergleich der Leistungsfähigkeit von Parenchymzellen aus anderen in vitro Systemen und dem Ganztier bietet.

Charakteristisch für die Perifusion ist eine wesentlich verstärkte Ureogenese, die schon frühzeitig um ein mehrfaches über der in diskontinuierlicher Kultur gemessenen liegt. Sie reicht damit, besonders unter dem Einfluß von Glucagon an vergleichbare Syntheseraten im Ganztier heran (323) und liegt weit über der perfundierten Leber (219, 257) unter ähnlichem Substratangebot. Diese Steigerung kann, wie auch die beschleunigte Monolayerbildung, als Ausdruck einer rasch und gründlich verlaufenden Erholung der Zellen von den mannigfachen Schädigungen während der Isolation angesehen werden.

Die langanhaltenden, hohen steady-state Konzentrationen von

Aminosäuren wie Arginin, Asparagin und Glutamin im perifundierten System fördern zwar eine hohe Harnstoffsynthese, doch ist dies keinesfalls alleinige Ursache. Hierfür spricht der Befund, daß ein erhöhtes Angebot von Aminosäuren, Peptiden und besonders von NH_3 zu einer weiteren Zunahme der Ureogenese bei perifundierten Hepatozyten führt. Besonders interessant ist ferner, daß die Syntheseleistung unter maximalem Substratangebot über 10 Tage nahezu unverändert bleibt, während bei diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten unter denselben Bedingungen ein ebenso rascher Verfall der Synthesekapazität eintritt wie bei normalem Substratangebot.

Der fördernde Einfluß einer erhöhten extrazellulären Albuminkonzentration auf die Ureogenese perifundierter Leberparenchymzellen beruht vermutlich darauf, daß die intrazelluläre Akkumulation von Lipiden und damit einhergehende Zellschädigungen vermieden werden (siehe Abschn. 4.1.3.). Ein teilweiser Abbau von nativem oder auch denaturiertem Serum-Albumin ist unwahrscheinlich, da hierfür offensichtlich nicht-parenchymale Zellen in der Leber verantwortlich sind (265).

Die regulatorischen Eigenschaften der Ureogenese diskontinuierlich kultivierter und perifundierter Hepatozyten sind sich zu Beginn der Kultur sowohl qualitativ als auch quantitativ sehr ähnlich. So steigert Glucagon die Harnstoffsynthese in vergleichbarem Ausmaß wie in der perifundierten Leber (61, 219) und in frisch isolierten Hepatozyten (349, 375). Mit zunehmender Kultivierungsdauer geht die Stimulierbarkeit in diskonti-

nuierlich kultivierten Zellen sehr rasch zurück, während sie in perifundierten Hepatozyten nur langsam absinkt. Die Ergebnisse an der perifundierten Kultur zeigen ferner, daß ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Synthese von Harnstoff aus Ammoniak der Kontrolle durch Glucagon unterliegt. Ein ähnlicher Befund wurde von frisch isolierten Hepatozyten berichtet (375). Diese Hormonwirkung tritt unmittelbar nach Einwirken des Hormons auf, was vermuten läßt, daß hierzu keine Proteinbiosynthese erforderlich ist.

Andererseits zeigt der "konditionierende" Einfluß von Glucagon, der die basale Syntheserate ansteigen läßt (s. Abschn. 3.1.3.4.), daß zusätzlich bleibende Veränderungen durch Glucagon bewirkt werden. Diese könnten die Stimulation des Aminosäuretransports (61, 171) und die des Glutamat-Transportsystems der Mitochondrien (223) einschließen. Ferner könnte hieran eine Induktion der Harnstoffzyklusenzyme durch Glucagon beteiligt sein, worauf an späterer Stelle eingegangen wird (Abs. 4.2.2.).

Die Stoffwechseltätigkeit der kultivierten Hepatozyten in bezug auf den Stickstoffstoffwechsel wird in ganz besonderer Weise durch die Veränderungen des Aminosäuremusters im Kulturmedium reflektiert, zu denen sowohl der Intermediärmetabolismus als auch der Protein-Turnover beitragen. Während solche Änderungen bei diskontinuierlicher Kultivierung leicht meßbar sind, gehört es geradezu zum Wesen der Perifusion, die Konzentrationsdifferenzen möglichst gering zu halten und zu kaschieren. Dieser Sachverhalt verhindert einen unmittelbaren Vergleich zwischen

beiden Kultursystemen. Eine Gegenüberstellung wird erst möglich, wenn ein größerer Eingriff in die Perifusion vorgenommen wird, der allerdings die Aussagekraft des Vergleichs etwas einschränkt. So stehen letztlich den kurzfristigen Veränderungen beim diskontinuierlichen System, die während der ersten beiden Tage gemessen wurden, langfristige Änderungen bei der Perifusion gegenüber, die sich über einen Zeitraum von sieben Tagen erstreckten.

Überraschenderweise zeigten sich nur geringfügige Unterschiede zwischen den Änderungen des Aminosäuremusters bei beiden Kultursystemen. Hieraus kann - mit dem erwähnten Vorbehalt - auf eine qualitativ ziemlich ähnliche Stoffwechselsituation der kultivierten Hepatozyten geschlossen werden.

Das Ergebnis scheint ferner darauf hinzudeuten, daß in der Perifusion ein Zustand, der bereits zu Beginn der Kultivierung vorliegt, mit nur geringfügigen Änderungen über längere Zeit hinweg aufrechterhalten wird.

Über diese allgemeinen Feststellungen hinaus können die beobachteten Änderungen Hinweise darauf geben, in welchem Umfang a) die Konzentrationen einer Art homöostatischer Kontrolle durch die Leberzellen unterliegen, b) Aminosäuren als Substrate herangezogen werden und c) ein Abbau von Protein zu den Veränderungen beiträgt.

Da die Konzentrationen der Aminosäuren im Kulturmedium - von wenigen Ausnahmen abgesehen - den Verhältnissen im Pfortaderblut kurz nach einer proteinreichen Mahlzeit entsprechen, sollte mit einer ausgeprägten Aufnahme besonders der rasch metabo-

lisierbaren Aminosäuren und einer nur geringfügigen Änderung bei denjenigen gerechnet werden, die von der Leber nicht oder nur sehr langsam verstoffwechselt werden. In der Tat stimmt (bei diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten) das Aufnahmemuster, d.h. die relative Aufnahme, bei fast allen leicht metabolisierbaren Aminosäuren qualitativ gut mit dem Ausmaß der Aufnahme in vivo überein (153, 300). Die Kinetik der Aufnahme läßt vermuten, daß gewisse Regulationsmechanismen einer Homöostase wirksam sind. Hierzu paßt auch die weitgehende Konstanz der Alaninkonzentration, die bereits etwa der des arteriellen Blutes entspricht (153, 320). Bei Serin, dessen Konzentration im Kulturmedium zu niedrig ist, zeigt sich dementsprechend eine Konzentrationszunahme.

Eine mögliche Ausnahme bilden Arginin und Glutamin, die beide fast vollständig (in 24 Stunden) aus dem Kulturmedium aufgenommen werden. Die gemessenen Änderungen erscheinen jedoch verständlich, wenn man berücksichtigt, daß Arginin wahrscheinlich von der Niere und Glutamin vom Muskel an das Blut abgegeben werden, und die Leber beide Aminosäuren eher aufnimmt als abgibt (vgl. 1.2. und 1.4.).

Die Tatsache, daß Glutamin trotz Konzentrationen unter 2 mM gut von den kultivierten Hepatozyten aufgenommen und metabolisiert wird, stimmt dabei gut mit neueren Befunden (60, 132) überein, wonach dies nur geschieht, wenn zugleich Ammoniumionen in größerer Konzentration vorliegen. Gerade letztere Bedingung trifft jedoch auf das Kulturmedium zu.

Nicht vollständig zu einer homöostaseähnlichen Regulation

paßt der relativ konstante Glutamatspiegel, der viel zu hoch liegt. Er ist jedoch höchstwahrscheinlich eine Folge des langsamen Eintransports von Glutamat in Leberparenchymzellen (140), wobei die Nettoaufnahme zusätzlich durch die rasche intrazelluläre Bildung von Glutamat aus Glutamin verringert sein dürfte.

Die geringfügigen Konzentrationszunahmen bei Isoleucin, Leucin, Lysin, Tryptophan, Tyrosin und Valin deuten auf einen Nettoabbau von Protein hin. Obwohl die Frage offen bleiben muß, was die Ursache für eine erhöhte Proteindegradation ist, stehen diese Änderungen doch in bemerkenswerter Übereinstimmung mit den Befunden von Schimassek und Gerok (320) an der perfundierten Leber. Es ist jedoch durchaus möglich, daß es sich hierbei weniger um eine homöostatische Kontrolle handelt, als vielmehr schlicht um ein Zeichen für eine negative Stickstoffbilanz (vgl. unten).

Unter hormoneller Beeinflussung treten insgesamt nur wenige Abweichungen von diesem Änderungsmuster auf. Dexamethason führt zu einer rascheren Abnahme der Tyrosinkonzentration, was eine Folge der Induktion der TAT sein dürfte. Es bewirkt ferner, in guter Übereinstimmung mit Befunden in vivo (32), eine Steigerung der Alaninbildung.

Außerdem ist die Abgabe der verzweigtkettigen Aminosäuren, sowie von Tryptophan und besonders Lysin deutlich reduziert, was als Hinweis auf einen mehr ausgeglichenen Proteinturnover in Gegenwart dieses Hormons angesehen werden kann.

Wachstumshormon führt nur bei Alanin zu einer signifikanten Abweichung (d.h. Zunahme), was im Gegensatz zu Befunden an der

isolierten Leber steht (155). Ob dies darauf zurückzuführen ist, daß Wachstumshormon eher kurzfristige Änderungen bewirkt, die bei einer 24-stündigen Inkubation rückgängig gemacht werden, ist dem vorliegenden Datenmaterial nicht mit Sicherheit zu entnehmen.

In der perifundierten Kultur ergaben sich - wie bereits angedeutet - über einen Zeitraum von 7 Tagen sehr ähnliche Veränderungen wie im diskontinuierlichen System zu Beginn der Kultivierung. Abweichungen, wie sie bei Aspartat, Arginin und Cystein auftreten, dürften im wesentlichen quantitative Unterschiede darstellen, die als Folge des willkürlichen Abbruchs der Perifusion in Erscheinung treten. Dagegen kommt der Abnahme von Valin und Leucin wahrscheinlich grundsätzlichere Bedeutung zu, da sie gegen einen überwiegenden Proteinabbau in der Perifusion spricht.

Insgesamt zeigen diese Messungen, daß es unter den Bedingungen der diskontinuierlichen Kultur bereits innerhalb von 24 Stunden zu drastischen Änderungen im Aminosäuregehalt des Kulturmediums kommt, während im perifundierten System mit weitgehend konstanten Konzentrationen gerechnet werden kann. Trotzdem zeigen die unterschiedlich kultivierten Hepatozyten eine sehr ähnliche Präferenz für die einzelnen Aminosäuren. Offenbar werden Aspartat, Arginin und Glutamin bevorzugt metabolisiert. Die übrigen Aminosäuren werden entweder kaum umgesetzt oder streben Konzentrationen an, die denen des arteriellen Blutes entsprechen.

Letzteres deutet auf eine aktive Kontrolle der Konzentrationen eines Teils der Aminosäuren durch die kultivierten Hepatozyten hin, ähnlich wie dies von Schimassek und Gerok an der perifundierten Leber beschrieben wurde (320). Es bleibt aber unklar, ob es sich hierbei nur um ein ähnliches Endresultat oder darüber hinaus auch um ähnliche Kontrollmechanismen handelt. In diesem Zusammenhang bleibt zu bedenken, daß die Zellmasse in vitro um Größenordnungen kleiner ist als in der intakten Leber, und sich somit die Änderungen in völlig anderen Zeiträumen abspielen. Während bei Kurzzeitversuchen von Schimassek und Gerok noch davon ausgegangen werden konnte, daß eine Beeinflussung durch den veränderten hormonellen Status von untergeordneter Bedeutung ist, muß diese bei den Kulturen als voll wirksam angenommen werden. Die Perifusion zeigt jedoch, daß dieselben Eigenschaften unter günstigen Bedingungen auch in der Langzeitkultur aufrechterhalten bleiben. Da seriell propagierte Primärkulturen menschlicher Leber ein gänzlich andersartiges Muster von Aufnahme- und Abgabepräferenz für Aminosäuren zeigen (197), berechtigt das Ergebnis an der Perifusion zu der Annahme, daß das beobachtete Muster ziemlich gut die Präferenzen der Rattenleber widerspiegelt. Ferner kann vermutet werden, daß die leberspezifische homöostatische Kontrolle von Aminosäurekonzentrationen eine ähnlich hohe Stabilität aufweist wie beispielsweise die Ureogenese.

Die Berechnung einer Stickstoffbilanz aus den Konzentrationsdifferenzen der Aminosäuren im Kulturmedium einerseits und der

Harnstoffbildung andererseits liefert zwar interessante Hinweise auf die Gesamtstoffwechselsituation der kultivierten Hepatozyten, ist jedoch mit gewissen Unzulänglichkeiten behaftet, die bei der Anwendung dieses Kriteriums sorgfältig abgewogen werden müssen.

Besonders störend wirkt sich bei der Bilanzierung aus, daß die von den Zellen aufgenommene Stickstoffmenge nur mit einer sehr großen Fehlerbreite angegeben werden kann, da die einzelnen Konzentrationen aus der Aminosäureanalyse nur ungenau ermittelt werden können, und sich diese Einzelfehler addieren. Es sind jedoch nicht nur Meßungenauigkeiten, die den Aussagewert des Ergebnisses mindern, weit wichtiger ist vielmehr, daß eine wichtige Stickstoffquelle, die extrazellulären Proteine, in ihrem quantitativen Beitrag nicht erfaßt werden kann.

Bekanntlich spielt die Leber eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von Plasmaproteinen einschließlich der Lipoproteine aus dem Blutplasma (191). Prinzipiell kann die Endozytose der Plasmaproteine sowohl von den Parenchymzellen, als auch von den Endothelzellen, besonders der Von Kupfferschen Sternzellen, oder beiden erfolgen.

Neuere Befunde deuten darauf hin, daß je ein Teil selektiv in einer der beiden Zellarten abgebaut wird (265, 373). Im einzelnen ist die Spezifität sowohl von Parenchymzellen als auch Nicht-Parenchymzellen gegenüber den Plasmaproteinen noch nicht bekannt; es scheint jedoch sicher zu sein, daß Albumin ausschließlich in Endothelzellen abgebaut wird (265). Obwohl Albumin die Hauptmasse des Proteins im Kulturmedium stellt und so-

mit die Menge des potentiell von den Parenchymzellen abbaubaren Proteins nicht sehr groß ist, steht zu vermuten, daß ein gewisser Teil hiervon von den kultivierten Hepatozyten als Stickstoffquelle genutzt wird. Ebenso quantitativ schwer erfaßbar ist die Menge der Proteine, die von den Hepatozyten synthetisiert und sezerniert werden. Wie mehrfach beschrieben, wird die Synthese von Plasmaproteinen und Lipoproteinen von kultivierten Hepatozyten über längere Zeit hinweg aufrechterhalten (35, 78, 195, 367); sie ist jedoch im Laufe der Kultivierung Schwankungen unterworfen (352). Trotz dieser Unzulänglichkeiten lassen sich an Hand der berechneten Stickstoffbilanz einige interessante Aussagen machen.

In der diskontinuierlichen Kultur tritt gewöhnlich eine negative Stickstoffbilanz auf, die zu groß erscheint, als daß sie durch den Abbau von extrazellulärem Protein kompensiert sein könnte. Dies deutet auf eine Degradation auch von zellulärem Protein hin, so daß die Situation hier ähnlich ist, wie in frisch isolierten Hepatozyten, wo ebenfalls die Proteindegradation überwiegt (338). In Gegenwart von Dexamethason findet sich dagegen eine positive Bilanz, die gut mit der Erhaltung des Gesamtproteins und dem besseren Erscheinungsbild der hormonbehandelten Kulturen übereinstimmt.

In der Perifusion konnte trotz einer langen Kultivierungsdauer sowohl mit als auch ohne Dexamethason eine positive Bilanz ermittelt werden. Dies fügt sich in die Reihe derjenigen Hinweise ein, die dafür sprechen, daß die Perifusion das adäquatere Kultursystem ist. Insbesondere könnte das Ergebnis dar-

auf hindeuten , daß bei perifundierten Hepatozyten die Synthese von Plasmaproteinen länger aufrechterhalten wird.

4.1.3. Allgemeine Stoffwechselcharakteristik der kultivierten Hepatozyten

Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen zum Stoffwechselgeschehen außerhalb des Stickstoffmetabolismus durchgeführt wurden, erscheint es angebracht, der allgemeinen Charakteristik des Stoffwechsels der kultivierten Zellen einen kurzen Abschnitt der Diskussion zu widmen. Hierbei soll vor allem auf den Lipidstoffwechsel abgehoben werden, der im Zusammenhang mit der massiven Akkumulation von Lipiden in perifundierten Hepatozyten von besonderem Interesse war.

Über die typische Stoffwechsellage von kultivierten Hepatozyten nach mehreren Tagen *in vitro* liegen derzeit nur ganz wenige Untersuchungen vor, die sich zumeist auf spezielle Stoffwechselwege beschränken. Aus diesem Grund läßt sich nur schwer ein umfassender Überblick gewinnen. Auch fügen sich die Einzeldaten - infolge abweichender Kulturbedingungen - nicht immer zweifelsfrei zu einem einheitlichen Bild. Im folgenden sei deshalb vor allem auf die Eigenschaften unter den hier verwendeten Kulturbedingungen (W/AB 77, Dexamethason, Insulin, etc.) abgehoben.

Grob charakterisiert scheint der Gesamtstoffwechsel der kultivierten Hepatozyten durch eine etwas verminderte Endoxidation über Citratzyklus und Atmungskette, einen Anstieg der Glykolyse (gepaart mit abnehmender Fähigkeit zur Gluconeogenese

(330) und vermutlich auch der direkten Glucoseoxidation im Pentosephosphatzyklus gekennzeichnet zu sein. Hierfür spricht die Abnahme der Aktivität von Enzymen der Atmungskette (159, 262),sowie die Zunahme von Glucoseutilisation (110, 330) und Lactatbildung (110). Auf einen Anstieg des Glucosedurchsatzes durch den Pentosephosphatzyklus deutet die Aktivitätszunahme von G6PDH und 6PGDH (70, 262) hin. Die verstärkte Bereitstellung von NADPH durch den Pentosephosphatzyklus könnte ihrerseits zu einer zunehmenden Synthese von Lipiden, besonders von Triglyceriden, führen. Die Akkumulation von Lipiden in den kultivierten Zellen, die bei der Perifusion unter bestimmten Bedingungen bedrohliche Ausmaße annimmt, muß jedoch nicht notwendigerweise auf eine vermehrte Synthese von Lipiden zurückgehen, sie kann vielmehr auch durch eine verminderte Abgabe der Lipide an das Medium bedingt sein. Obwohl das Ausmaß der Lipidsynthese offenbar stark von den jeweiligen Kulturbedingungen und der Anwesenheit von Hormonen beeinflußt wird, ist das Auftreten intrazellulärer Lipidtröpfchen eine allgemeine Charakteristik der primären Monolayerkultur von Leberparenchymzellen.

Wie aus Experimenten mit Kurzzeit-Kulturen entnommen werden kann, sind die Syntheseraten für Glycerolipide, Phospholipide und Cholesterin zu Beginn der Kultivierung mit den Raten in vivo gut vergleichbar (112, 113, 114, 188). Die Lipidsynthese kann zu diesem Zeitpunkt durch Glucagon und Insulin (113) oder durch Östradiol (188) in bekannter Weise reguliert werden und scheint auch in gewissem Maße einer "feed-back"-Regulation zu unterliegen (114). Über den Einfluß von Serum existieren wider-

sprüchliche Angaben. So wurde in Gegenwart von Foetalem Kälberserum sowohl über eine Steigerung (113) als auch über eine Hemmung (114) berichtet. Auch der Ernährungszustand der Ratten vor der Zellisolation scheint von Einfluß auf die Syntheseleistung der kultivierten Hepatozyten zu sein (44, 78).

Mit zunehmendem Alter der Kultur scheint eine hohe oder gar verstärkte Synthese von Triglyceriden nur noch in Anwesenheit von hohen Glucosekonzentrationen (> 20 mM) und Insulin aufzutreten. Unter anderen Kulturbedingungen wurde hingegen eine verminderte Synthese von Glycerolipiden und Phospholipiden beschrieben (188). Die Abnahme der HMGCoA-Reduktase deutet zudem darauf hin, daß auch die Cholesterin-Synthese verringert ist (202). Gerade die langfristige Entwicklung der Lipidsynthese und ihrer Kontrollmechanismen ist jedoch im Augenblick noch zu wenig untersucht, als daß eine eindeutige Tendenz erkennbar wäre.

Die Abgabe von Glycerolipiden an das Kulturmedium ist eng mit der Synthese von Apolipoproteinen und der Bildung von VLDL-Partikeln verknüpft. Über die Bildung von Lipoproteinen liegen unterschiedliche Ergebnisse vor (78, 188). Es scheint jedoch sicher zu sein, daß kultivierte Hepatozyten auch über längere Zeit VLDL-Partikel freisetzen können, wenngleich die Sekretionsraten unter denen der perfundierten Leber liegen und im Laufe der Kultivierung abnehmen (78). Aus den vorliegenden Daten läßt sich somit nicht klar entscheiden, welche Verschiebungen im Verhältnis von Lipid-Synthese und -Sekretion für die intrazelluläre Akkumulation von Lipiden verantwortlich ist. Auch über

die Rolle des Serum-Albumins, das in Konzentrationen, die dem Gehalt der Leberlymphe entsprechen, die rapide Anhäufung von Lipidtröpfchen in perifundierten Hepatozyten zu verzögern und zu reduzieren vermag, lassen sich derzeit nur Vermutungen anstellen. Es ist jedoch denkbar, daß das Serum-Albumin zusätzliche Kapazitäten zur Bindung von Lipiden schafft und damit die Abgabe desselben an das Medium fördert.

Über die Ursachen, die zu der beschriebenen Stoffwechselcharakteristik der kultivierten Zellen führen, existieren - infolge des lückenhaften experimentellen Materials - noch keine detaillierten Vorstellungen. Höchstwahrscheinlich kommt jedoch dem Insulin, das bereits zu Beginn der Kultivierung in hohen Konzentrationen eingesetzt wird, ein besonders prägender Einfluß zu. Ferner ist zu vermuten, daß spezifische nutritive und hormonelle Voraussetzungen, die die initiale Stoffwechsellage der Hepatozyten aufrechterhalten, durch die derzeit gebräuchlichen Kulturbedingungen noch nicht erfüllt werden. Hierfür sprechen unter anderem auch die unlängst durchgeführten Experimente, bei denen Parenchymzellen und Nicht-Parenchymzellen in Kokultur gehalten wurden (389).

Andererseits ist es möglich, daß die unvollständige, da nur zweidimensionale Ausbildung eines Gewebsverbandes gewisse Stoffwechselverschiebungen unumgänglich erzwingt. Dies wird beispielsweise durch verschiedene Hinweise gestützt, die für eine Art Cholestase in der Kultur sprechen. Ungeachtet solcher inhärenter Restriktionen bieten die Veränderungen des Intermediärstoffwechsels jedoch ein geradezu ideales Untersuchungsobjekt für das

Studium zellulärer Kontrollmechanismen und deren Beeinflussung.

4.1.4. Einflüsse der Kulturbedingungen

Die Ausformung eines flächenhaften, einschichtigen Zellverbandes mit gewebeähnlicher Morphologie aus dispergierten Zellen ist an eine Vielzahl zellspezifischer Voraussetzungen geknüpft. Bedeutsam in dieser Hinsicht sind nicht nur nutritive und hormonelle Faktoren, sondern auch verschiedenste Erkennungsphänomene, die über die Zelloberfläche vermittelt werden. Letztere umfassen sowohl Zell-Zell-Wechselwirkungen (147, 260), als auch solche der Zellen mit organischen und anorganischen Strukturmaterialien (354).

4.1.4.1. Substratum

Der Beschaffenheit der Unterlage oder des Trägers - auch Substratum genannt - , zu dem die Zellen den ersten Kontakt ausbilden, ist ein wichtiger Faktor bei der Determination der zellulären Entwicklungsvorgänge. Wie aus intensiven Untersuchungen über die Eignung verschiedenartiger Materialien als Substrata für die Zellkulturen hervorgeht, muß das Substratum zum einen die Zellen von zytotoxischen Materialien (z.B. Glas) fernhalten und fördert auf diese Weise das Überleben der Zellen *in vitro* (309, 398). Zum anderen vermittelt es den kultivierten Zellen eine Art von "natürlicher Umgebung" und ermöglicht es diesen, sowohl die eigene, zellspezifische Gestalt anzunehmen, als auch mit Nachbarzellen in ebenfalls zelltypische Wechselwirkun-

gen einzutreten.

Beide Phänomene scheinen eng mit der Ausprägung einer Vielzahl von phänotypischen Eigenschaften verbunden zu sein (108), was als Grund dafür angesehen werden kann, daß dem Substratum eine bedeutende Rolle bei den verschiedensten Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen zukommt (45, 376), es im ungünstigen Fall jedoch auch pathologische Entwicklungen verursachen kann (346).

Zum Zeitpunkt dieser Voruntersuchungen lagen noch keine speziellen Untersuchungen zur Frage optimaler Substrata von Leberparenchymzellen vor. Außer den gebräuchlichen Gewebekulturplatten aus Plastik mit speziell behandelter Oberfläche waren vor allem kollagenbeschichtete Petrischalen zur Primärkultivierung verwendet worden (201).

Ein vielversprechender Ansatz schienen auch "schwimmende" Kollagenmembranen zu sein, deren besondere Eignung jedoch zu dieser Zeit nur vermutet wurde (241). Zusätzlich waren verschiedene Untersuchungen von anderen Zellarten bekannt, die unter anderem auf gewisse Vorzüge von Beschichtungen mit denaturiertem Serum-Albumin hinwiesen (214).

Vor diesem Hintergrund wurden die Versuche von Abschn. 3.1.2.1. zur Ermittlung eines günstigen Substratums durchgeführt, wobei von vornherein auf die Anwendung schwimmender Kollagengele verzichtet wurde, da deren mechanische Eigenschaften keine Entnahme von Teilen der Zellpopulation bei der Perifusion ermöglicht hätten. Obwohl mit denaturiertem Albumin eine hervorragende Anheftung und Ausbreitung erzielt werden konnte,

wurde der Kollagenbeschichtung letztlich der Vorzug gegeben, da bei Verwendung von denaturiertem Albumin der Proteingehalt der Zellen nicht als Bezugsgröße hätte verwendet werden können.

Im Laufe dieser Arbeit wurden einige Untersuchungen veröffentlicht, die die Bedeutung des Substratums klar erkennen lassen und gewisse Hinweise auf die Natur der Wechselwirkung geben (311, 312, 339, 393). Danach muß zwischen der bloßen Anheftung und einer Bindung unterschieden werden, die bereits mit einem Stimulus zur Änderung der Zellmorphologie einhergeht. Erstere kann über verschiedenste ionale und Rezeptor-Liganden Wechselwirkungen zustande kommen (312, 392). Letztere hingegen, die bei serum-beschichteten Oberflächen oder Kollagen auftritt, gibt Anlaß zur Ausbreitung der Zellen und induziert damit die Ausbildung einer differenzierten Zellmorphologie (122, 123). Die Anheftung an Kollagen scheint magnesiumabhängig zu sein (312, 339) und benötigt bei Leberparenchymzellen, im Gegensatz zu Fibroblasten (168), keine Mitwirkung von Fibronektin (312). Dieses Oberflächenprotein, das als 'cold insoluble Globulin' (CIG) im Plasma vorliegt (280) (bekannt auch als LETS-Protein (149)), vermittelt jedoch die Anheftung von Hepatozyten an verschiedene andere Substrata (312, 339). Es dürfte auch im Falle der Beschichtung mit denaturiertem Albumin die Bindung der Hepatozyten bewirken.

4.1.4.2. Kulturmedium

Die Bedeutung der Zusammensetzung des Kulturmediums für die Entwicklung der Hepatozyten soll hier nur in dem Maße angesprochen werden, als dies im Zusammenhang mit der Einführung eines neuen Mediums in dieser Arbeit nötig erscheint.

Auf generelle nutritive Aspekte soll hier nicht eingegangen werden, da hierfür wertvolle Übersichten von Ham (135) und Eagle (90), als auch in verschiedenen Standardwerken zur Zellkultur vorliegen (178, 308, 398). Für die besonderen Anforderungen der Hepatozytenkultur liegen jedoch im Augenblick keine zusammenfassenden Darstellungen vor. Es soll jedoch gleich an dieser Stelle betont werden, daß Hepatozyten aus adulter Leber, die in Kultur nicht zur Teilung angeregt werden sollen, im Vergleich zu anderen Epithelzellen (135) erstaunlich anpassungsfähig sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Kultivierung von Leberparenchymzellen eine Modifikation von Waymouth's MB 752/1 Medium vorgeschlagen, das bezüglich gewisser Ergänzungen, auf die weiter unten eingegangen werden soll, den Anforderungen dieser Zellen speziell entgegen kommt.

Mit diesem Medium konnte besonders im Bereich des Stickstoffmetabolismus eine weitgehende Stabilisierung der Stoffwechselraten und der Enzymaktivitäten erreicht werden. Darüber hinaus blieben auch gewisse regulatorische Eigenschaften in diesem Stoffwechselbereich besser erhalten.

Die grundsätzliche besondere Eignung von geringfügig verändertem Waymouth MB 752/1 Medium wurde bereits von Bonney et al.

(39) und Pariza et al. (272) hervorgehoben. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber L-15 Medium dürfte darin liegen, daß übermäßig hohe Konzentrationen einzelner Aminosäuren vermieden werden. Auch spiegelt die Aminosäurezusammensetzung von Pariza's HiWo/BA-Medium (272), als auch von W/AB 77 in etwa die Verhältnisse im Pfortaderblut nach einer Mahlzeit wider und ist dadurch physiologisch eher adäquat, als eine Reihe anderer Medien, die zur Kultivierung von Hepatozyten verwendet wurden.

Eine schlüssige Antwort, ob das W/AB 77 Medium allgemein die Qualität der kultivierten Hepatozyten erhöht, muß ergänzenden Experimenten überlassen bleiben. In bezug auf das Überleben der Zellen in der Langzeitkultur konnte kein Unterschied zwischen diesem und dem Originalmedium von Waymouth beobachtet werden. Auch ist es möglich, daß die hohen Metabolitspiegel den Zellen einen Zustand permanenter "Überfütterung" signalisieren, was teilweise den Übergang zu Stoffwechsellagen bedingen könnte, die durch verminderte Fähigkeit zur Gluconeogenese und einer Überproduktion von Triglyceriden gekennzeichnet ist. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß durch die kurzfristige Kultivierung in aminosäurearmem Medium die Induktion von Aminosäuretransportsystemen hervorgerufen werden konnte (166), ähnlich wie dies von Leberschnitten bekannt ist (369).

Nach diesen allgemeinen Überlegungen soll im folgenden kurz auf die Veränderungen eingegangen werden, die bei der Formulierung des W/AB 77 Mediums am Originalmedium von Waymouth vorgenommen wurden.

Die Konzentrationen der anorganischen Salze wurden abgeändert und an der Zusammensetzung des Rattenserums orientiert; sie entsprechen nun etwa den Konzentrationen des von Krebs und Henseleit (175) angegebenen physiologischen Puffers. Die Calciumionen-Konzentration wurde auf 2 mM erhöht, um die Bindung durch das zusätzlich vorhandene Rinder-Serum-Albumin auszugleichen. Ferner wurde das Medium mit geringen Mengen von Spurenelementen angereichert.

In bezug auf die Glucose wurde die Konzentration auf normale physiologische Werte (5,5 mM) begrenzt. Als weitere Substrate wurden dem Medium Lactat und Pyruvat im physiologischen Verhältnis, sowie Oleat zugesetzt. Die Konzentration an freiem Oleat ist allerdings unbekannt, da ein Großteil durch das Serum-Albumin gebunden werden dürfte. Oleat gehört zu den natürlichen Substraten der Leber, die zur Energiegewinnung herangezogen werden (401).

Das Spektrum der Aminosäuren wurde durch die zwar nicht essentiellen, jedoch für Hepatozyten wichtigen Aminosäuren Alanin, Serin und Ornithin ergänzt. Die übermäßig hohe Konzentration des Glutamins wurde herabgesetzt, liegt mit 2 mM aber immer noch wesentlich höher als im arteriellen Blut (174).

Bei den Vitaminen wurde der Anteil von Ascorbinsäure und Cholinchlorid etwas vermindert. Zusätzlich wurden dem Medium δ-Aminolävulinsäure und L-Carnithin zugesetzt. Die δ-Aminolävulinsäure fördert offensichtlich die Häm-Synthese (129, 131), da bei den kultivierten Hepatozyten die δ-Aminolävulinsäure-Synthase an Aktivität verliert (239). L-Carnitin geht offenbar

während der enzymatischen Isolation der Hepatozyten teilweise verloren (68) und muß für einen optimalen Ablauf der Fettsäureoxidation zugesetzt werden (69, 223). Nach neueren Befunden von Barth (20) soll der Zusatz von Carnitin bei kultivierten Hepatozyten jedoch ohne Wirkung sein.

4.1.4.3. Serum

Die Bedeutung des Serums liegt ganz allgemein in der Bereitstellung unbekannter nutritiver Faktoren, sowie von Hormonen, die für die Aufrechterhaltung lebenswichtiger Funktionen notwendig sind (315). Bei replizierenden, jedoch nicht-transformierten Zellarten wird Serum besonders deshalb zugesetzt, um den Zellen spezifische Wachstumsfaktoren zur Verfügung zu stellen. Mit zunehmender Kenntnis der speziellen Anforderungen einzelner Zellarten können entsprechende nutritive und hormonelle Ergänzungen die Supplementation von Serum überflüssig machen (107).

In neuerer Zeit wurden vielfach Ansätze beschrieben, auch primäre Leberzellkulturen in serumfreien Medien zu halten (35, 171, 201). Bei diskontinuierlicher Kultivierung ist dies offensichtlich für einen Zeitraum von 24 Stunden unproblematisch. Längerfristige Kultivierung unter denselben Bedingungen erscheint insofern ebenfalls möglich, als im Vergleich mit serumhaltigem Medium bisher kein Ausfall wichtiger Stoffwechselleistungen beschrieben wurde. Es muß in serumfreiem Medium jedoch stets mit dem Absterben einer Teilpopulation der Zellen gerechnet werden (201).

Sowohl dieser letzte Befund, als auch die Tatsache, daß in der Perifusion ein Überleben der Hepatozyten insgesamt für mehr als zwei Tage in serumfreiem Medium nicht möglich ist, sprechen eindeutig dafür, daß die bislang unternommenen Versuche zur serumfreien Kultivierung die eigentlichen Probleme bei der Kultivierung von Hepatozyten nur kaschieren. Der drastische Unterschied zwischen diskontinuierlicher Kultur und Perifusion läßt sich dahingehend interpretieren, daß gewisse lebenswichtige Faktoren aus dem Serum, die möglicherweise von den Hepatozyten selbst synthetisiert werden, in der Perifusion derart aus den Zellen herausverdünnt werden, daß diese keine Chance zum Überleben haben. Sollte dies zutreffen, so ist die Frage zu stellen, ob diese Faktoren nicht auch in der diskontinuierlichen Kultur in Konzentrationen vorliegen, die gewisse Funktionen der Zellen entscheidend limitieren, ohne deshalb gleich zum Zelltod zu führen.

Es scheint in diesem Zusammenhang noch interessant, daß bei diskontinuierlicher Kultivierung die besten Ergebnisse hinsichtlich der Erhaltung der Zellen in Gegenwart von 15 - 20 % Serum erhalten werden, während in der Perifusion - infolge der ständigen Zufuhr - schon 2 % Serum noch wesentlich bessere Resultate liefern.

4.1.4.4. Hormone

Der Zusatz von Serum reicht im allgemeinen aus, um den Hepatozyten Hormone und spezifische Faktoren in ausreichendem Maße zur Verfügung zu stellen, so daß sich ein überwiegender Teil

der Zellen an die in vitro Bedingungen adaptieren und die Monolayerbildung einleiten kann. Ein zusätzliches Angebot von Hormonen ist also keinesfalls unabdingbare Voraussetzung, wie von Michalopoulos und Pitot (241) im Falle des Insulins betont. Es erhöht jedoch zweifellos die Überlebenschancen der Zellen und hebt die Zellqualität in funktioneller Hinsicht. Für Primärkulturen von Leberparenchymzellen adulter Ratten wurde der Einfluß von Insulin von Laishes und Williams (186) und von Bernaert et al. (29) eingehender untersucht. Hierbei konnte eine höhere Absetzrate und längere Überlebenszeit beobachtet werden. Zusätzlich fand sich eine Reihe ultrastruktureller Änderungen: Gehäufte Einlagerungen von Glykogenpartikeln zwischen die Zysternen des (unter Insulin) stärker ausgedehnten und vermehrten glatten Endoplasmatischen Retikulums, auch fanden sich zahlreiche Polysomen. Nach ungefähr fünf Tagen in Kultur neigen die Hepatozyten zur Akkumulation von Lipiden in größeren Lipidtröpfchen. Daneben können selbstverständlich alle bekannten Induktionsphänomene und andere Wirkungen des Insulins beobachtet werden. Insulin wird heute von der Mehrzahl der Autoren zumindest während der Initialphase der Kultur verwendet.

Ein weiteres wichtiges Hormon ist das Dexamethason. Neben der allgemeinen unterstützenden Wirkung, die beispielsweise eine längere Einhaltung der epithelialen Morphologie und eine längere Lebensdauer zur Folge hat (187), scheint es viele Stoffwechselleistungen der kultivierten Hepatozyten durch permissive Effekte zu fördern, wofür es von Leberparenchymzellen bereits viele Beispiele gibt (vgl. Abschn. 4.2.1.1.). Im Rah-

men dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Hepatozyten unter Einfluß dieses Glucocorticoids eine ausgeglichenere Stickstoffbilanz aufweisen. Die unterstützende Wirkung des Dexamethasons bei der Ausbildung der Zellmonolayer läßt sich, wie in unserem Laboratorium beobachtet werden konnte (R. Gebhardt, G. Schirmer, H. Metzler und R. Clark, unveröffentlicht), nur bei der als Regelfall zu bezeichnenden Zellpräparation und -kultur nachweisen, nicht jedoch dann, wenn Zellen mit hervorragender Vitalität isoliert werden konnten, was jedoch nur bei jeder 3. bis 5. Präparation der Fall ist. Dexamethason wurde und wird daher in unserem Laboratorium besonders deshalb für die Kultivierung verwendet, weil hierdurch die Unterschiede von Kultur zu Kultur minimiert werden können.

Bei Zusatz von Hormonen ist ganz allgemein mit einer Zunahme von DNS-Synthese und Zellteilungen zu rechnen. Besonders die Kombination von Insulin und Glucagon (194), bzw. die zusätzliche Gabe von EGF, führt zu einem starken Anstieg der DNS-Synthese (301). Für den Eintritt in die Mitose und Auslösung der Proliferation bedarf es jedoch weiterer Voraussetzungen (vgl. Abschnitt 5.3.). Möglicherweise sind hieran auch spezielle Faktoren beteiligt, wie dies an Kulturen fötaler Leberzellen wahrscheinlich gemacht werden konnte (192).

4.2. Hormonale Regulation

4.2.1. Die Regulation der Glutamin-Synthetase

4.2.1.1. Dexamethason

Die Mitwirkung des Glucocorticoids Dexamethason bei der Aktivitätssteigerung der Glutamin-Synthetase zeigt zwei herausragende Eigenschaften: a) das Fehlen einer signifikanten Antwort auf das Hormon allein und b) eine Konditionierung der Hepatozyten in der Weise, daß Wachstumshormon unmittelbar nach seiner Einwirkung die Stimulation in Gang zu setzen vermag, d.h. eine Reduzierung der lag-Phase dieses Prozesses. Auf Grund dieser Charakteristika läßt sich der Effekt des Dexamethasons - nach Ingle (151) - als "permissive" Wirkung bezeichnen. Allgemein versteht man hierunter den modulierenden Einfluß eines Hormons auf die Aktion eines anderen, so daß jenes ein optimales Wirkungsspektrum entfalten kann. Bislang sind permissive Wirkungen von Glucocorticoiden von einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen bekannt geworden (117), die in der Mehrheit durch Peptidhormone und / oder Katecholamine unter Vermittlung von cAMP reguliert werden. Da auch in dieser Arbeit mit der Induktion der Enzyme des Harnstoffzyklus ein Beispiel einer solchen Wechselwirkung gefunden wurde, sei hierauf an anderer Stelle eingegangen (s. Abschn. 4.2.2.2.).

Im Falle der Interaktion von Glucocorticoiden und Wachstumshormon bei Stimulation der Glutamin-Synthetase scheint es sich um eine andere Art von permissiver Wirkung der Glucocorticoide

zu handeln, da von Wachstumshormon angenommen wird, daß es in der Regel nicht über zyklische Nukleotide wirkt (279, 285), obwohl einzelne Wechselwirkungen mit zyklischen Nukleotiden beschrieben wurden (51, 217).

Ferner zeigt die Wirkung von Dexamethason die Besonderheit, daß geringe Konzentrationen des Hormons nur dann wirksam sind, wenn eine mehrmalige Anwendung dieser Hormon-Dosen während der gesamten Inkubationszeit erfolgt. Wie bereits in Abschn. 3.2.7. dargelegt, ist eine kontinuierliche Anwesenheit effektiver Hormonkonzentrationen (die sehr klein sein können!) offenbar eine unmittelbare Voraussetzung für ein kontinuierliches Fortschreiten des Stimulationsvorgangs.

Zusammen mit dem Befund, daß die Glucocorticoidwirkung durch Cycloheximid und Puromycin aufgehoben werden kann (s. Abschn. 3.2.10.), läßt sich - in Übereinstimmung mit einer permissiven Funktion - die Wirkungsweise von Dexamethason folgendermaßen erklären.

Das Glucocorticoid induziert die Synthese eines oder mehrerer Proteine, die die Initiation der Wachstumshormonwirkung ermöglichen. Nach den Ergebnissen der Hemmversuche (Abschn. 3.2.10.) scheint dieser Syntheseprozeß länger als vier Stunden zu währen, bis wirksame Konzentrationen dieser Proteine vorliegen. Auf diese Weise könnte die lag-Phase der Stimulation zustande kommen.

Die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Präsenz des Hormons scheint ferner darauf hinzudeuten, daß die "permissiven" Proteine einem raschen Turnover unterliegen und somit nicht nur

für die Initiation, sondern auch die Aufrechterhaltung der Stimulation durch Wachstumshormon nötig sind.

Die skizzierte Vorstellung zur Wirkungsweise des Dexamethasons berücksichtigt die Annahme, wonach ein Großteil der molekularbiologischen Wirkungen der Steroidhormone durch Transkriptionskontrolle im Zellkern zustande kommt. Dieser Kontrollwirkung geht nach neueren Vorstellungen (309) die Bindung an spezifische cytoplasmatische Rezeptoren voraus, die dadurch aus einer inaktiven in eine aktive Form überführt werden. Nach einer temperaturabhängigen Umwandlung des aktiven Rezeptors gelangt dieser in den Zellkern und entfaltet dort nach Wechselwirkung mit den Nuklearakzeptorstellen die biologische Wirkung.

4.2.1.2. Wachstumshormon

Die Wirkung des Wachstumshormons auf die Stimulation der Glutamin-Synthetase scheint komplexer Natur zu sein und mehrere Aspekte zu umfassen, die sich klar voneinander unterscheiden lassen.

Für die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ist die Frage nach der Lebensdauer des Wachstumhormons in den Hepatozyten-Kulturen von entscheidender Bedeutung. Obwohl bislang keine direkten Angaben zu diesem Punkt in der Literatur vorliegen, lassen sich doch einige nützliche Überlegungen hierzu anstellen.

So dürften die hier verwendeten Hormonmengen höchstwahrscheinlich in weniger als vier Stunden vollständig inaktiviert sein, da angenommen werden kann, daß die Inaktivierungskapazi-

tät der kultivierten Zellen derjenigen frisch isolierter Hepatozyten (88) entspricht. Ferner gibt es verschiedene Hinweise darauf, daß die Wirkung dieses Hormons sehr schnell ausgelöst und daher durch die fortschreitende Inaktivierung nicht limitiert wird. Hierfür spricht einmal das Auftreten eines Plateaus in der Konzentrations/Hormonantwort-Kurve (vgl. Abs. 3.2.6.). Ein weiterer Hinweis ergibt sich aus der Tatsache, daß eben diese Kurve bei verringerter Zelldichte (also langsamerer Inaktivierung) nicht zu niedrigeren Hormonkonzentrationen verschoben ist.

Nach diesen Vorüberlegungen soll nun die Rolle des Wachstumshormons im einzelnen diskutiert werden. Zunächst werden mehrere mutmaßliche Eigenschaften der Hormonwirkung angeführt, die sich aus den experimentellen Befunden ableiten lassen.

Erstens: Wachstumshormon initiiert den Beginn der Aktivitätssteigerung der Glutamin-Synthetase ("Auslösewirkung"). Dieses Ereignis tritt offenbar sofort oder nach relativ kurzer Verzögerung ein, wenn die Hepatozyten mit Dexamethason zuvor konditioniert wurden (vgl. Abschn. 3.2.8.). Aus den Befunden, daß die Stimulation auch bei gleichzeitiger Gabe beider Hormone oder bei kurzzeitig verzögerter Gabe von Dexamethason nach Wachstumshormon (innerhalb von 2 Stunden) ausgelöst wird, läßt sich ferner schließen, daß die Auslösewirkung ein "Gedächtnis" von ca. 8 - 10 Stunden besitzt.

Zweitens: Das Hormon schaltet einen Mechanismus an, der für die Fortsetzung der Stimulation über mindestens 24 Stunden verantwortlich ist ("Kontinuitätswirkung"). Eine Eigen-

schaft, die sich unmittelbar aus der Annahme einer raschen Hormonaktivierung ergibt.

Drittens: Durch das Hormon wird ein Prozeß in Gang gesetzt, der zu einer fortschreitenden Steigerung der Geschwindigkeit des stimulatorischen Geschehens führt und für etwa 14 - 16 Stunden anhält ("Progressionswirkung").

Eine solche Schlußfolgerung läßt sich aus den Ergebnissen ziehen, die bei den Vorinkubationsexperimenten (Abschn. 3.2.9.) erhalten wurden. Obwohl für die volle Wirkung eine aktive Proteinsynthese nötig ist, scheint sie auch andere Mechanismen einzuschließen (Abschn. 3.2.10.). Ferner scheint diese Wirkung des Wachstumshormons von der permissiven Funktion des Dexamethasons unabhängig zu sein.

Viertens: Kurze Zeit nach der Einwirkung des Wachstumshormons auf die Hepatozyten beginnt eine Refraktärperiode von ungefähr 8 - 10 Stunden Dauer ("Refraktorität").

Hierauf scheint hinzudeuten, daß die Konzentrations/Hormonantwort-Kurve ein Plateau enthält, während die Zugabe einer für optimale Wirkung gerade ausreichenden Menge Wachstumshormon nach 10 - 12 Stunden eine weitere Steigerung der Aktivität der Glutamin-Synthetase bewirkt. Noch direkter gestützt wird diese Annahme durch die Unwirksamkeit weiterer Hormongaben innerhalb eines 8-Stunden Intervalls nach der ersten Einwirkung von Wachstumshormon (Abschn. 3.2.6.).

Die Beziehungen zwischen den vier mutmaßlichen Eigenschaften lassen sich an Hand der vorliegenden Ergebnisse nicht ohne weiteres erkennen. So bleibt fraglich, ob zwischen den Eigenschaf-

ten 'eins' und 'zwei' eine engere Beziehung besteht, da beide zwar eine gewisse Art von "Gedächtnis" zu besitzen scheinen, dieses jedoch unterschiedlich lange anhält.

Die dritte Eigenschaft der Hormonwirkung könnte unspezifischer Natur sein, also nur mittelbar mit der Wirkung auf die Glutamin-Synthetase verknüpft sein. Beispielsweise würde ein allgemein fördernder Einfluß von Wachstumshormon auf die Proteinbiosynthese (172) gut zu der Gesamtcharakteristik der Stimulation passen.

Ferner kann vermutet werden, daß die Refraktorität der Hormonwirkung, die hier nur in bezug auf die dritte Eigenschaft festgestellt wurde, generell alle Hormonwirkungen betrifft. Die Funktion des "Gedächtnisses", insbesondere beim Auslöseeffekt, könnte dann darin bestehen, gewisse Prozesse den Auswirkungen einer solchen allgemeinen Refraktorität zu entziehen.

Das Auftreten von Refraktärperioden, die mehrere Stunden andauern können, wurde auch von Versuchen in vivo (267) als auch in vitro (5) berichtet. Hierbei waren die Wirkungen von Wachstumshormon auf den Aminosäure- und Zuckertransport am Zwerchfell von Ratten untersucht worden. In diesem Fall wurde für die Auslösung der Refraktorität ein mutmaßliches inhibitorisches Protein verantwortlich gemacht (144).

Es ist jedoch auch ein Mechanismus denkbar, der auf Rezeptorebene eingreift, ähnlich wie dies von anderen Hormonen berichtet wurde (57, 368). Auch an anderen Geweben der Ratte wurden Desensibilisierungs- und Refraktoritätserscheinungen in bezug auf Wachstumshormon beschrieben (368).

Die zeitlichen Beziehungen der einzelnen Wirkungen und ihre Auswirkungen auf die gemeinsame Aktion von Wachstumshormon und Dexamethason ist zusammenfassend in Abb. 40 dargestellt. Hieraus wird deutlich, daß eine genaue zeitliche Abstimmung der Einwirkung beider Hormone nötig ist, um eine Stimulation der Glutamin-Synthetase zu ermöglichen. Nach den vorangegangenen Erörterungen ist ein optimales Zusammenspiel offenbar dann gegeben, wenn die Glucocorticoidwirkung der Wachstumshormonwirkung um etwa acht Stunden vorauseilt. Diese Anforderung des Modells steht in relativ guter Übereinstimmung mit dem Auftreten der Konzentrationsmaxima der Hormone in vivo. Während die Ausschüttung von Glucocorticoiden bei Ratten ihren Höchstwert kurz vor Beginn der Dunkelperiode (404) erreicht, tritt der Maximalwert der Wachstumshormon-Konzentration erst gegen Ende der Dunkelperiode ein (350). Die Existenz gelegentlicher kurzzeitiger Wachstumshormonschübe (220a) könnte ferner eine Basis für die im Modell erkennbaren Wirkungen dieses Hormons abgeben, die vom Einfluß von Glucocorticoiden unabhängig sind.

4.2.1.3. Trijodthyronin und Insulin

Trijodthyronin scheint allgemein die Geschwindigkeit des Stimulationsprozesses zu fördern. Damit rückt seine Wirkung in die Nähe der Eigenschaft 'drei' der Wachstumshormonwirkung. Es bleibt jedoch eine offene Frage, ob ein gemeinsamer Angriffspunkt, etwa über eine Steigerung der Proteinsynthese (358), vorliegt.

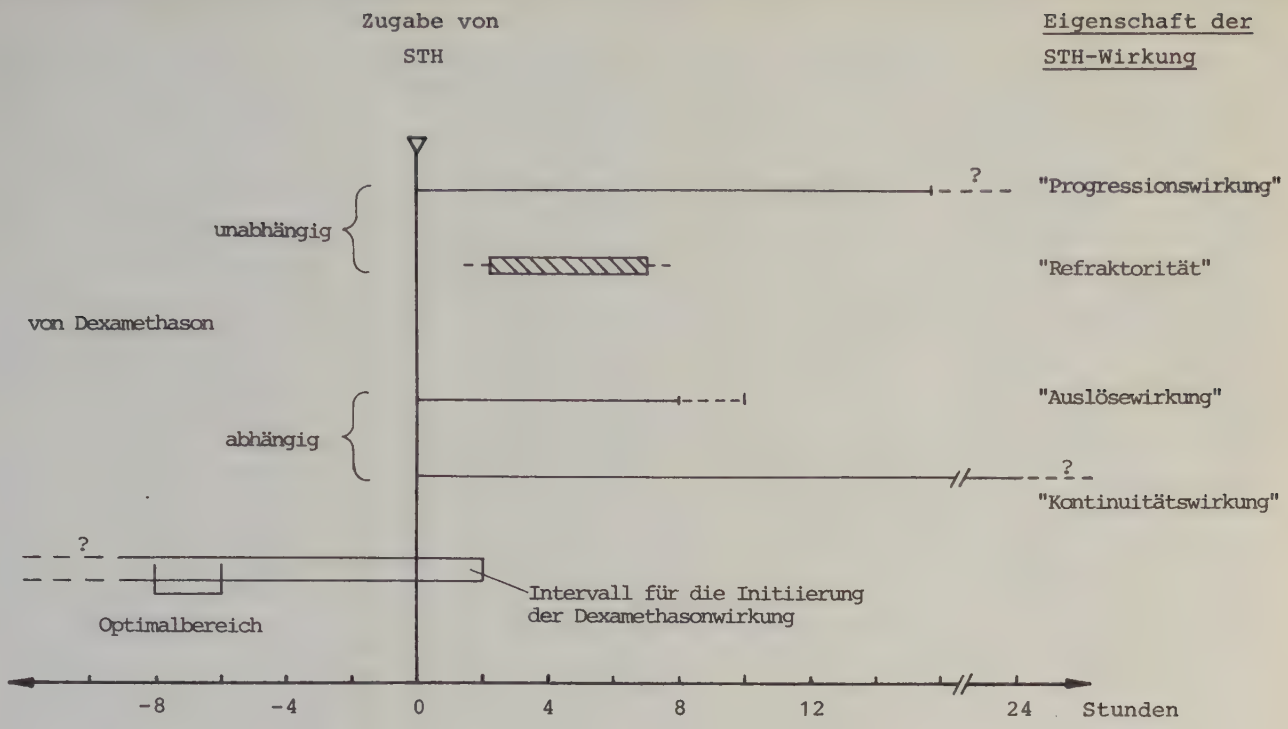


Abb. 40: Übersicht über die zeitlichen Beziehungen der Wachstumshormonwirkungen zueinander und der Abstimmung mit der Initiierung der Dexamethasonwirkung bezogen auf den Zeitpunkt der Zugabe von Wachstumshormon.

Die Wirkung von Insulin ist mit der von Trijodthyronin partiell identisch, was den anabolen Charakter dieses Einflusses noch mehr hervorhebt. Offenbar zeigt jedoch Insulin noch andere Wechselwirkungen mit den Aktivitätsänderungen der Glutamin-Synthetase. Einerseits verlangsamt die Anwesenheit dieses Hormons die initialen Aktivitätsänderungen des Enzyms, andererseits führt es jedoch zu einer Verminderung der Wirkung von Wachstumshormon und Dexamethason.

Die vorliegenden Versuchsergebnisse tragen nur wenig zu einem Verständnis dieser verschiedenartigen Wechselwirkungen bei. Auf Grund des Unterschiedes der Insulinwirkung vor und nach der Initiation des Stimulationsprozesses muß jedoch gefordert werden, daß Insulin an zwei Stellen in die Wachstumshormonwirkung eingreift. Eine steigernde Wirkung, die über eine allgemeine Erhöhung der Proteinsynthese-Kapazität zustande kommt (s. oben), würde gut zu einem Angriffspunkt nach Auslösung der Enzym-Stimulation passen. Als Wirkung mit Angriffspunkt vor der Auslösung ist beispielsweise eine Veränderung der Rezeptorkonzentration denkbar. Für eine solche Möglichkeit sprechen unter anderem die Ergebnisse von Baxter und Turtle (23), die eine reziproke Beziehung zwischen der Anzahl der Wachstumshormonrezeptoren von Leberzellen und der Insulin-Konzentration des Pfortaderblutes fanden. Es könnte somit durch die hohen Konzentrationen von Insulin zu Beginn der Kultivierung zu einer Verringerung der Hormonrezeptoren für Wachstumshormon kommen.

4.2.1.4. Die Regulation in vitro

Fügt man die oben besprochenen Einzelaktionen der Hormone zusammen, so läßt sich die hormonelle Regulation der Glutamin-Synthetase als ein komplexes Gefüge ineinandergreifender Hormonwirkungen beschreiben. Hierbei kommt dem Wachstumshormon als Auslöser des Stimulationsprozesses eine zentrale Funktion zu. Kaum minder wichtig erscheint jedoch die Rolle der Glucocorticoide, deren Aktion die Voraussetzungen für die Wachstumshormonwirkung schafft.

Trijodthyronin und Insulin hingegen scheinen erst sekundär durch mehrfache Wechselwirkung mit dieser Regulationseinheit zu einer Modulation der Enzymaktivität zu führen.

Mit dieser Hypothese lassen sich alle Beobachtungen, die den Einfluß der untersuchten Hormone betreffen, hinreichend erklären. Offen bleibt, warum die Stimulation der Glutamin-Synthetase nur innerhalb enger zeitlicher Grenzen (2. und 3. Kulturtag) ausgelöst werden kann. Da sich die Wirkung von Glucocorticoiden auf die Tyrosin Aminotransferase zu jeder beliebigen Zeit nachweisen läßt, scheint die Einschränkung besonders das Wachstumshormon zu betreffen. Für dessen Wirkungslosigkeit sind mehrere Ursachen denkbar. Hierzu zählen der Verlust von Wachstumshormonrezeptoren als Folge proteolytischer Einwirkungen während der Zellisolation, eine Refraktärperiode zu Beginn der Kultivierung und eine starke Beeinträchtigung der Wachstumshormonwirkung durch die anfänglich sehr hohen Konzentrationen an Insulin (vgl. Abschn. 4.2.1.3.). Ein Verlust von Rezeptoren bei der Zellisolation erscheint jedoch unwahrscheinlich,

da frisch isolierte Zellen solche Rezeptoren enthalten (77, 289, 296). Eine Refraktärperiode müßte noch in der Ratte vor der Zellpräparation ausgelöst worden sein. Denkbar wäre dies durch Ausschüttung von Wachstumshormon, etwa als Folge von Streß (319).

Prinzipiell ähnliche Einflüsse könnten auch den initialen Aktivitätsabfall der Glutamin-Synthetase in unbehandelten Kulturen bedingen. Allerdings läßt der Unterschied zwischen den beiden Kultursystemen bezüglich dieser Aktivitätsänderung vermuten, daß noch andere hormonelle Faktoren oder Metaboliten an der Regulation beteiligt sind. So könnte beispielsweise der Verlust eines stabilisierenden Faktors eine verstärkte Degradation auslösen, womit der Verlauf der Basalaktivität hinreichend erklärt wäre. Auf Grund der hier vorgenommenen Messungen kann jedoch bereits eine Reihe von Aminosäuren, insbesondere Glutamin, von einer solchen Beteiligung ausgenommen werden (s. Abschn. 3.2.3.).

Unklar ist ferner der Einfluß der Zelldichte auf die hormonelle Stimulation der Glutamin-Synthetase. Die Vermutung, daß die Wirkung von Wachstumshormon durch eine Komponente des Mediums vermittelt wird, die gleichzeitig metabolisiert wird und deshalb in spärlichen Kulturen länger verfügbar bleibt, ließ sich nicht bestätigen. Weder durch einfache Messungen des Aminosäurespektrums und dessen Veränderungen unter Wachstumshormon noch durch Umsetzen der Kulturen auf verbrauchtes Medium konnte die Beteiligung einer solchen Komponente wahrscheinlich gemacht

werden. Eine Abhängigkeit der Glutamin-Synthetase-Aktivität von der Zelldichte, die jedoch der hier gefundenen genau entgegengesetzt ist, wurde von Teratomazellen in Kultur berichtet (73). Auch bei diesem System wurden keine Hinweise auf Einflüsse gefunden, die aus einer Verarmung des Mediums an Substraten resultieren könnten.

4.2.1.5. Überlegungen zum Mechanismus

Während die hormonellen Interaktionen an Hand des oben postulierten Wirkungsgefüges gut erklärt werden können, bleibt die Frage nach der molekularen Ursache der Aktivitätssteigerung der Glutamin-Synthetase unbeantwortet.

Leider mußte selbst auf einfache Hinweise, wie sie etwa durch den Einsatz von Hemmstoffen der Proteinbiosynthese hätten erhalten werden können, verzichtet werden, da die absolute Abhängigkeit der permissiven Wirkung des Dexamethasons von einer aktiven Proteinsynthese diese Möglichkeit ausschließt. Somit kann nur auf Grund des Verlaufs der Stimulation vermutet werden, daß eine Neusynthese von Enzymmolekülen an der Aktivitätssteigerung beteiligt sein könnte. Daneben ist auch eine Beeinflussung der Degradationsgeschwindigkeit denkbar, wie sie in vivo als Folge von Umstellungen in der Ernährung gefunden wurde (208). Andere Mechanismen (chemische Modifikation, makromolekulare Inhibitoren) sind jedoch ebenfalls nicht ausgeschlossen.

Auch aus dem Unterschied zwischen "früh" und "spät" perifundierten Hepatozyten lassen sich keine näheren Aussagen über den Mechanismus ableiten. Während die Befunde an "spät" peri-

fundierten Zellen die Gültigkeit der am diskontinuierlichen System gewonnenen Erkenntnisse bestätigt, weist das Ergebnis bei "früh" perifundierten Zellen lediglich darauf hin, daß eine weitere Aktivitätserhöhung über ein relativ hohes Niveau (vergleichbar der Aktivität in vivo) hinaus auf diesem Wege nur schwer möglich ist. Letzteres ist jedoch mit einer Vielzahl von Mechanismen vereinbar.

Eine interessante Überlegung zum Mechanismus ergibt sich noch aus der Gegenüberstellung der hormonellen Stimulation der Glutamin-Synthetase und der ebenfalls sehr komplexen hormonellen Kontrolle des α_{2_u}-Globulins. Dieses in der Leber synthetisierte und sezernierte Protein wird durch Androgene, Glucocorticoide, Schilddrüsenhormone und Wachstumshormon induziert und durch Östrogene reprimiert (182, 310, 351). Hierfür wurde vor kurzem von Feigelson und Mitarbeitern folgender Kontrollmechanismus vorgeschlagen (183, 184): Die hormonelle Kontrolle durch Androgene, Glucocorticoide und Schilddrüsenhormone kommt durch eine Modulation des cytoplasmatischen Gehalts an α_{2_u}-Globulin-mRNS zustande. In Abwesenheit von Wachstumshormon (Hypophysektomie) wird zwar der zytoplasmatische mRNS-Spiegel ebenfalls durch diese Hormone gesteigert und erreicht sogar nach 12 Tagen normale Werte, es findet jedoch keine Synthese und Sekretion des Proteins statt. Bei diesem Zustand liegt die untranslatierte mRNS zumeist frei oder als Monosomen oder Disomen im Cytoplasma vor. Erst durch Zugabe von Wachstumshormon kommt es zu einer sehr raschen Bildung membrangebundener Polysomen und einer sofortigen Synthese und Sekretion des α_{2_u}-Globulins.

Obwohl gewisse Unterschiede, insbesondere bezüglich der zeitlichen Dauer einzelner Teilschritte, zwischen der Regulation der α_{2u}-Globulin-Synthese und der Regulation der Glutamin-Synthese bestehen, ist doch eine erstaunliche Ähnlichkeit beider Prozesse nicht zu verkennen. Diese schließt sowohl die beteiligten Hormone, als auch den Auslöser-Effekt des Wachstumshormons ein. Es bedarf weiterer Untersuchungen, ehe zur Frage eines gleichartigen Regulationsprinzips - über die äußere Ähnlichkeit hinaus - Stellung bezogen werden kann.

Eine interessante Vermutung von Kurtz et al. (184) sei hier noch angefügt. Danach wird keine direkte Wirkung von Wachstumshormon angenommen; diese soll vielmehr über Somatomedine vermittelt werden, was die Substituierbarkeit von Wachstumshormon durch hohe Dosen Insulin erklären soll. In der Tat können Somatomedine, obwohl in der Leber gebildet (221, 284), an diesem Organ ihre Wirkung entfalten (24) und führen beispielsweise zu einer beträchtlichen Steigerung der Proteinbiosynthese.

4.2.1.6. Regulatorische Phänomene in Hepatomazellen - die Rolle von Glutamin

Hepatome - spezielle von der Leber abgeleitete Tumore - haben im Zusammenhang mit der Frage, welche Veränderungen von Kontrollmechanismen mit der malignen Transformation einhergehen, große Bedeutung erlangt.

Bei Glutamin-Synthetase fanden Louie et al. (208), daß deren Aktivität bei verschiedenen Morris Hepatomen gerade umgekehrt reagiert wie die entsprechende der Wirtsleber, wenn Umstellun-

gen im Proteingehalt der Nahrung vorgenommen werden. Diese Unterschiede resultieren aus entgegengesetzten Änderungen der Halblebenszeiten der Enzyme aus Tumor und Leber, obwohl diese in ihren immologischen und kinetischen Eigenschaften identisch scheinen.

Auch bei der direkten hormonellen Kontrolle der Glutamin-Synthetase in Tumoren bestehen offenbar Unterschiede zur Leber in vivo, sowie zu den Befunden der vorliegenden Arbeit. So wird die Glutamin-Synthetase in gewissen Zellinien der Hepatoma tissue culture (HTC) Zellen, sowie in Chinesischen Hamster-Leberzellen durch Glucocorticoide allein induziert (180, 372). Die Aktivitätssteigerung konnte durch Actinomycin D und Cycloheximid gehemmt werden (181) und beruht nach den Befunden von Crook et al. (76) ausschließlich auf einer Neusynthese von Enzymprotein. Auf Grund dieser Eigenschaften könnte vermutet werden, daß als Folge der Transformation in Hepatoma-Zellen ein vollständiger Verlust der dominierenden Rolle von Wachstumshormon bei der Kontrolle der Glutamin-Synthetase eingetreten ist.

Eine weitere interessante Eigenschaft des Regulationsmechanismus der HTC-Zellen und Chinesischen Hamsterzellen ist die Beeinflussung der Glutamin-Synthetase-Aktivität durch die extrazelluläre Glutamin-Konzentration (180, 372). An beiden Systemen konnte übereinstimmend nachgewiesen werden, daß Glutamin die Degradationsgeschwindigkeit des Enzyms beeinflußt (10, 75, 255). Hieran scheint ein labiles, durch Glutamin stabilisiertes Protein beteiligt zu sein, das in Gegenwart und Abwesenheit von Glutamin synthetisiert wird (103).

Auch von verschiedenen anderen tierischen Zellinien ist eine Beeinflussung der Glutamin-Synthetase-Aktivität durch extrazelluläres Glutamin beschrieben worden (81, 167, 277, 363). Im Gegensatz hierzu konnte in der vorliegenden Arbeit kein Effekt der extrazellulären Glutamin-Konzentration auf die Enzymaktivität beobachtet werden. Dies gilt sowohl für die Basalaktivität des Enzyms als auch für die hormonelle Stimulation und ist unabhängig von der Wahl des Kultursystems.

Damit besteht eine gute Übereinstimmung mit den Befunden an der Leber in vivo, wo ebenfalls keine Wirkung von Glutamin beobachtet werden konnte (174, 402, 403). Da die intrazelluläre Konzentration des Glutamins in der perfundierten Leber nur unwesentlich durch Hypophysektomie und Wachstumshormon beeinflußt wird (402), ist es zudem sehr unwahrscheinlich, daß ein Zusammenhang zwischen dem mutmaßlichen Verlust der Kontrollfunktion des Wachstumshormons und der Glutaminwirkung bei Hepatomazellen existiert.

4.2.1.7. Regulation in vivo und physiologische Bedeutung

An Hand des postulierten Wirkungsgefüges von Wachstumshormon, Glucocorticoiden und Schilddrüsenhormonen läßt sich eine hinreichende Erklärung geben für die verschiedenartigen und teilweise kontroversen Ergebnisse aus Studien in vivo bezüglich der möglichen Regulation der Glutamin-Synthetase durch diese Hormone.

Nach Gabe von Glucocorticoiden in vivo kann eine Stimula-

tion des Enzyms, je nach dem Serumspiegel des Wachstumshormons, auftreten oder ausbleiben. Hierbei dürfte die Antwort der Hepatozyten noch zusätzlich davon abhängen, ob diese sich gerade in einem refraktären Zustand gegenüber Wachstumshormon befinden. Aus diesen Gründen kann vermutet werden, daß alle Stimuli, die den endokrinen Status bezüglich Wachstumshormon verändern, wie Streß (319), Diät und Hunger (54), pulsierende Ausschüttung von Wachstumshormon (71) etc., ebenfalls modulierend auf den Einfluß von Glucocorticoiden auf die Glutamin-Synthetase wirken sollten.

Umgekehrt erscheint die Wirkung von Wachstumshormon vor allem an eine zeitgerechte Konditionierung der Hepatozyten durch Glucocorticoide gebunden. Diese scheint im intakten Tier durch die Abfolge der Hormonausschüttungen, die in guter Übereinstimmung mit den Anforderungen des postulierten Wirkungsgefüges steht (vgl. 4.2.1.2.), gesichert, dürfte jedoch ebenfalls leicht aufzuheben sein.

Die physiologische Bedeutung dieser Regulation könnte in einer Umverteilung des Stickstoffs im Organismus liegen. Aminosäuren, die unter dem Einfluß von Wachstumshormon verstärkt zur Gluconeogenese herangezogen werden (79, 400), könnten ihren α-Amin-Stickstoff auf Glutamin übertragen und diesen so für die Wiederverwendung zur Proteinsynthese in peripheren Organen nutzbar machen.

Hierfür spricht nicht nur die Stimulation der Proteinsynthese durch Wachstumshormon, beispielsweise im Muskel, sondern auch die verminderte Harnstoffbildung unter dem Einfluß dieses Hormons.

Da die Glutamin-Synthetase keine kurzzeitigen Aktivitätsschwankungen zeigt, dürfte eine Beeinflussung nach der einen oder anderen Seite auf Grund dieses Regulationsmechanismus an längerfristige und einschneidende Umstellungen im endokrinen Zustand eines Tieres gebunden sein. In dieser Hinsicht besonders bedeutsam könnten die Perioden intensiven Wachstums eines Organismus sein, was gut mit dem drastischen Aktivitätsanstieg des Enzyms übereinstimmt, der in neonataler Leber beobachtet wurde (174, 402).

4.2.2. Die Regulation der Enzyme des Harnstoffzyklus

4.2.2.1. Glucagon und cAMP

Die Ergebnisse der Perifusion von Hepatozyten mit Glucagon zeigen, daß dieses Hormon alle Enzyme des Harnstoffzyklus, wenngleich in unterschiedlichem Ausmaß, zu induzieren vermag. Dies ist am perifundierten System sogar mit Hormonkonzentrationen von 5×10^{-9} M möglich, die noch durchaus als physiologisch gelten können (215).

Mit diesem Resultat konnte die Annahme, daß Glucagon induzierend auf einige Enzyme des Harnstoffzyklus wirkt, die aus Untersuchungen *in vivo* an pankreatektomierten (227) und normalen Ratten (355) abgeleitet worden war, nicht nur eindeutig bestätigt, sondern auf alle fünf Harnstoffzyklusenzyme erweitert werden. Eine gleichsinnige Schlußfolgerung aus Ganztierversuchen, die aus Befunden unter Verwendung von kristallinem Zink-Glucagon gezogen worden war, wurde im Laufe der vorliegenden Arbeit von Snodgrass et al. (357) veröffentlicht.

Nach heute allgemein gültiger Vorstellung wird die Wirkung von Glucagon durch cAMP als sogenanntem "second messenger" vermittelt (42, 94), dessen Bildung hormonabhängig von dem Enzym Adenylat-Zyklase katalysiert wird. Dies scheint in gleicher Weise für rasche Steuerungsvorgänge des Metabolismus (33, 141), wie für die längerwährende Induktion verschiedener Enzyme (285), beispielsweise solchen der Gluconeogenese (386), zu gelten.

Als initialer Mechanismus der Glucagonwirkung wird dabei eine Sequenz von Ereignissen diskutiert, die die Wechselwirkung mit einem Rezeptor in der Plasmamembran und die nachfolgende Aktivierung der ebenfalls membrangebundenen Adenylat-Zyklase einschließt (304). Die Aktivität des hormonsensitiven Adenylat-Zyklase-Systems, das vermutlich aus Rezeptor, katalytischer Einheit und Kopplungskomponente (=regulatorische Einheit) besteht (206, 283, 303), wird in komplexer Weise streng von GTP kontrolliert (Übersicht s. Helmreich et al. (139)), sowie durch zahlreiche andere Nukleotide (305) und durch Prostaglandine vom E-Typ (161, 374) beeinflußt.

Die hier durchgeführten Untersuchungen mit Dibutyryl-cAMP berechtigen zu der Annahme, daß auch im Falle der Harnstoffzyklusenzyme die Wirkung von Glucagon über cAMP vermittelt wird. Dibutyryl-cAMP wird häufig als cAMP-Analoges verwendet, obwohl es beispielsweise ein relativ schwacher Aktivator der Proteinkinase ist (165, 248) und auch als Enzyminduktor keine optimalen Wirkungen zeigt (395). Es gelangt jedoch rasch ins Innere von Leberzellen (240), während cAMP selbst nur bei höheren Dosen ausreichend permeabel (ohne Ab- und Umbau) ist

(381). Ein wesentlicher Grund für die schwächere Wirkung von Dibutyryl-cAMP scheint die Tatsache zu sein, daß es erst zu N^6-monobutyryl-cAMP (und / oder cAMP selbst) umgeformt werden muß (38, 248).

Die hier verwendete Dosis von 2×10^{-5} M erbrachte eine gute Übereinstimmung mit den Glucagoneffekten, insbesondere in Anwesenheit von Dexamethason. Eine Stimulierung des cAMP-Spiegels durch Adrenalin, das über die Wechselwirkung mit ß-adrenergen Rezeptoren der Leberzellen einen Anstieg des cAMP-Gehalts bewirkt (286), blieb hingegen ohne Einfluß auf die Enzymaktivitäten. Offenbar müssen gewisse Anforderungen hinsichtlich Kinetik und Ausmaß der intrazellulären cAMP-Stimulierung erfüllt werden, damit die Induktion der Harnstoffzyklusenzyme ausgelöst werden kann.

Während Adrenalin nur zu einer schwachen und rasch abklingenden Stimulation des cAMP-Spiegels führt (92), ist die Stimulation als Antwort auf Glucagon etwa 10-fach höher und geht bei kontinuierlicher Infusion des Hormons erst allmählich (bis 60 min.) zurück (92). Ob auf Grund dieser Unterschiede generell vermutet werden kann, daß die Harnstoffzyklusenzyme durch Katecholamine nicht induziert werden können, erscheint fraglich. Verschiedene Befunde weisen darauf hin, daß die Effekte von Katecholaminen an Leberplasmamembranen von gleicher Größe sein können wie die von Glucagon, wenn gleichzeitig GTP anwesend ist (138, 198).

4.2.2.2. Dexamethason

Dexamethason führte in Gegenwart von Glucagon zu einer Potenzierung der Glucagonwirkung, während es selbst nur geringfügige Aktivitätserhöhungen bewirkte. Letztere könnten auf den Einfluß von Glucagon aus dem Serumanteil des Kulturmediums zurückgehen, da sie besonders deutlich nur bei denjenigen Enzymen auftreten, die durch Glucagon allein relativ gut stimuliert werden.

Eine vergleichbare Steigerung der Glucagonwirkung konnte durch Vorinkubation der Hepatozyten mit Glucocorticoiden erzielt werden. Der Einfluß des Dexamethasons weist demnach auch hier die Merkmale einer "permissiven" Wirkung auf (s. Abschn. 4.2.1.1.). Abweichend von der Wechselwirkung mit Wachstumshormon ist jedoch im vorliegenden Fall eine ständige Anwesenheit von Dexamethason nicht erforderlich, was auf eine stabilere Konditionierung der Hepatozyten hindeutet.

Ähnliche permissive Wirkungen bei Stoffwechselprozessen, die über cAMP reguliert werden, sind in neuer Zeit häufig beschrieben worden (117, 370). Beispiele fanden sich bei der Lipolyse (95, 340), der Glykogenolyse (318), der Gluconeogenese (93, 106) und neuerdings bei der Induktion des Aminosäuretransports durch Glucagon (171). Auch in bezug auf die direkte Induktion von Enzymen wurden permissive Wirkungen beschrieben (91, 394).

Obwohl nach heutigem Wissensstand die Wirkung der Steroidhormone von cAMP unabhängig ist, zeigen die angeführten Beispiele, daß eine eindeutige Wechselwirkung zwischen Glucocorticoiden und zyklischen Nukleotiden existiert, deren Mechanismus jedoch

noch unbekannt ist (117, 370). Diskutiert wurden unter anderem Einflüsse auf den Phosphodiesterasespiegel und die intrazelluläre Calciumkonzentration. Im vorliegenden Fall scheint eine Wirkung des Dexamethasons über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels sehr unwahrscheinlich, da eine gleichzeitige Gabe von Glucagon und Bt_2-cAMP keine Steigerung gegenüber Glucagon allein erbrachte (s. Abschn. 3.3.6.). Eine charakteristische lag-Phase, die dem Glucocorticoideffekt vorausgeht, und die auf eine Interaktion des Hormons mit der Zelle auf der Ebene der Translation, wenn nicht gar Transkription hindeutet (370), scheint jedoch auch im Falle der Stimulation der Harnstoffzyklusenzyme vorhanden zu sein.

4.2.2.3. Die molekulare Ursache des Aktivitätsanstiegs

Auf die Frage nach der molekularen Ursache des Aktivitätsanstiegs der Harnstoffzyklusenzyme ist nach den vorliegenden Ergebnissen keine abschließende Antwort möglich. Die Aufhebung der Hormoneffekte zu über 90 % durch Cycloheximid spricht stark dafür, daß eine Neusynthese von aktiven Enzymmolekülen für die Aktivitätszunahme verantwortlich ist. Im Fall der Arginase konnte dies vor kurzem von Snodgrass et al. (357) mit immunchemischen Verfahren bei Versuchen in vivo schlüssig nachgewiesen werden.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß auch eine verringerte Degradation zum hormonell bedingten Anstieg der Enzymaktivitäten beiträgt.

Eine solche Möglichkeit wurde zumindest für die Arginase ebenfalls bei Studien in vivo durch Immuntitrationen wahrscheinlich gemacht. So konnte Schimke (326) nachweisen, daß im Hunger die Degradation dieses Enzyms weitgehend reduziert ist.

Änderungen der Halblebenszeit der Harnstoffzyklusenzyme als Folge der Kulturbedingungen wurden bereits in Abschn. 4.1. diskutiert. Eine zusätzliche Änderung als Antwort auf die Hormonbehandlung (und damit die Beteiligung der Degradation an dieser Regulation) wird auch aus dem Aktivitätsverlauf der Enzyme nach Hormongabe wahrscheinlich. Führt man eine mathematische Analyse einfacher Modellvorstellungen zum Enzymturnover durch (327, 328), so zeigt sich, daß die Zeitkonstante für das Erreichen einer neuen 'steady state'-Konzentration des Enzyms gleich der Zeitkonstante für die Degradation ist, unabhängig, ob die Aktivitätsänderung durch verminderte Synthese oder Degradation zustande kommt.

Legt man für die Arginase eine Halblebenszeit von ca. 7 Stunden zugrunde (77), so läßt sich leicht nach obiger Methode berechnen, daß die in dieser Arbeit gefundenen Aktivitätsänderungen für dieses Enzym nur bei gleichzeitiger Verlängerung der Halblebenszeit erklärbar sind. Ähnliches gilt im Falle der Carbamoylphosphat Synthase und der Ornithin Transcarbamoylase, wenn Schätzwerte für die Halblebenszeit (77) herangezogen werden. Mit diesen Annahmen ergibt sich eine gute Übereinstimmung der Befunde in vivo und in vitro.

Es muß jedoch der Vollständigkeit halber erwähnt werden, daß Schimke bei seinen Untersuchungen zur Gewichtung von Synthese

und Degradation bei den Aktivitätsänderungen der Arginase stets von einer Halblebenszeit des Enzyms von 4 - 5 Tagen ausging (326). Mit dieser Annahme führt eine mathematische Analyse zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen, wodurch eine derart hohe Halblebenszeit für das Enzym unwahrscheinlich wird.

4.2.2.4. Die Ausprägung der Glucagonwirkung in den verschiedenen Kultursystemen

Die stark differierenden Hormonantworten bei den Harnstoffzyklusenzymen in perifundierten und diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten berechtigen zu der Frage nach den möglichen Ursachen. Ohne an dieser Stelle auf den Grad der funktionellen Intaktheit und die Leistungsfähigkeit der unterschiedlich kultivierten Zellen eingehen zu wollen (vgl. Abschn. 4.1.2. und 5.1.), sei hier festgestellt, daß höchstwahrscheinlich weder die Art der Hormonapplikation (hier Dauerinfusion, dort schrittweise Zugabe) noch eine eventuell geringfügig verschiedene Empfindlichkeit gegenüber Glucagon für die unterschiedlichen Hormoneffekte verantwortlich sein kann. Im Gegenteil muß auf Grund der erfolgreichen Induktion der Tyrosin Aminotransferase auch im diskontinuierlichen System davon ausgegangen werden, daß auch solcherart kultivierte Hepatozyten - mit gewissen Einschränkungen hinsichtlich des Ausmaßes der Hormonantwort bei länger anhaltender Kultivierung - völlig analog zu Leberparenchymzellen in vivo auf Glucagon zu reagieren vermögen. Ähnliche Hinweise von Glucagonwirkungen an Monolayerkulturen liegen von Gluconeogenese (19), Lipolyse (112, 113) und Aminosäuretrans-

port (170) vor, wobei sogar die permissive Wirkung von Glucocorticoiden beobachtet werden konnte. Von Untersuchungen der Glykogenolyse und Gluconeogenese (330) ist jedoch evident, daß bei der Wirkung von Glucagon im Laufe der diskontinuierlichen Kultivierung mit einem Rückgang des quantitativen Umfangs der Effekte gerechnet werden muß.

Als mögliche Ursachen für die unterschiedliche Hormonantwort kommen möglicherweise die Beteiligung weiterer Hormone oder eine Interferenz der Hormonstimulation mit anderen Komponenten des Mediums in Betracht.

Eine Beteiligung weiterer Hormone (die ihre Wirkung in der Perifusion infolge der stetigen Zufuhr frischen Serums besser entfalten könnten als im diskontinuierlichen System) ist nicht ganz auszuschließen; es gibt jedoch hierfür im Augenblick keine Hinweise.

Für eine Wechselwirkung der Hormonstimulation mit Komponenten des Mediums spricht hingegen die Unterdrückung des Glucagoneffekts auf die Arginase durch hohe Konzentrationen von Leucin in der Perifusion. Über die Natur dieser Wechselwirkung bzw. über die Aktion des Leucins, die hier erstmals beschrieben wurde, ist bislang noch nicht viel bekannt. Sicher scheint jedoch, daß der Effekt von Leucin von der Art des verwendeten Kulturmediums und damit von anderen Bestandteilen des Mediums, wahrscheinlich Aminosäuren, abhängig ist.

Möglicherweise ist die Wirkung weniger eine Funktion der absoluten Konzentration an Leucin, als vielmehr die eines bestimmten Verhältnisses zwischen Leucin und anderen Aminosäuren.

Während in der Perifusion ein solches Verhältnis, etwa durch Erhöhung der Leucin-Konzentration, aktiv eingestellt werden muß, könnte sich dieses im diskontinuierlichen System passiv, auf Grund des Metabolismus der Hepatozyten (s. Abschn. 4.1.2.), einstellen. Auf diese Weise, etwa über das Verhältnis Leucin/ Arginin, könnte der an perifundierten Hepatozyten beobachtete Leucineffekt auch eine Erklärung für das Ausbleiben der Glucagonantwort im diskontinuierlichen System liefern.

Obwohl diese Überlegungen nur rein spekulativen Charakter besitzen, bleibt anzumerken, daß Schimke an kultivierten - allerdings transformierten - Säugerzellen eine komplexe Wirkung von Arginin auf das argininsynthetisierende Enzymsystem und auf die Arginase fand (322).

Ein wichtiger Unterschied zwischen beiden Kultursystemen in bezug auf die Harnstoffzyklusenzyme ist die Konstanz der Enzymaktivitäten in der Perifusion und deren Veränderung im diskontinuierlichen System (Abschn. 3.1.4.1.). Da diese Veränderungen im diskontinuierlichen System entweder auf eine sinkende Syntheserate oder eine verstärkte Degradation zurückgehen, ist es ebenso denkbar, daß eine Hormonwirkung, die sich selbst dieser Mechanismen bedient, ziemlich gestört wird, so daß eine signifikante Hormonantwort erst nach längerer Einwirkungszeit erkennbar ist.

Eine solche Ansicht erfährt durch die Befunde von Lin und Snodgrass, die kürzlich als Abstract veröffentlicht wurden (203), eine gewisse Bestätigung. Diese Autoren berichteten von einer Glucagonwirkung in Gegenwart von Dexamethason im gewöhn-

lichen Kultursystem, die allerdings nur zu einer Induktion der zytoplasmatischen Enzyme führte. Der teilweise Widerspruch zu den vorliegenden Ergebnissen scheint jedoch auf Grund der verschiedenen experimentellen Bedingungen erklärbar: Beginn der Stimulation am 2. Kulturtag (wo die Hepatozyten größere funktionelle Integrität besitzen), Verlängerung der Expositionszeit auf 48 Stunden und schließlich die Verwendung von L-15 Medium ohne Bicarbonat-Puffer (204). Unter den Bedingungen einer solchen Inkubation kann davon ausgegangen werden, daß der Stoffwechsel der kultivierten Hepatozyten erheblich reduziert ist (110, 132). Dies könnte - entsprechend obiger Hypothese - zu gänzlich anderen und damit unwirksamen Verhältnissen von Leucin zu anderen Aminosäuren führen.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die eindeutige Ausprägung der Hormonantwort in der Perifusion höchstwahrscheinlich durch die Konstanz des extrazellulären Milieus begünstigt wird, während die Änderungen dieses Milieus, die bei diskontinuierlicher Kultivierung auftreten, zu einer Gegensteuerung führen könnten.

4.2.2.5. Die Regulation *in vivo* und die physiologische Bedeutung

Nach den vorausgegangenen Darlegungen läßt sich die hormonelle Kontrolle der Harnstoffzyklusenzyme durch Glucagon und Dexamethason folgendermaßen zusammenfassen:

Glucagon induziert alle fünf Enzyme des Harnstoffzyklus über

einen cAMP-abhängigen Mechanismus. Der unterschiedliche Verlauf der einzelnen Enzymaktivitäten ist wahrscheinlich bedingt durch verschiedene Halblebenszeiten der Enzymproteine. Glucocorticoide ermöglichen bzw. potenzieren die Induktion durch Glucagon über eine sogenannte "permissive Wirkung". Diese Hormongruppe führt jedoch selbst zu keinen Veränderung der Enzymaktivitäten.

Ausgehend von dieser hypothetischen Interaktion ist es nunmehr möglich, die verschiedenartigen Befunde in vivo bezüglich der Wirkungen von Glucagon und von Glucocoricoiden zueinander in Beziehung zu setzen und zu erklären:

Bei Verwendung von adrenalektomierten Ratten ist - aus Mangel an Glucocorticoiden - keine optimale Wirkung des applizierten Glucagons möglich, so daß es zu einem Absinken der Enzymspiegel kommen kann. Je nach Konzentration der Restglucocorticoide ist eine mehr oder weniger starke Varianz der Glucagonantwort einzelner Enzyme möglich.

Umgekehrt kann die Verabreichung von Glucocorticoiden zu einer Verstärkung der induzierenden Wirkung physiologischer Konzentrationen von Glucagon führen. Da Glucocorticoide auch den Abbau von Proteinen in peripheren Organen fördern (21), könnte es, infolge des erhöhten Aminosäuregehalts im Blut, zu einer verstärkten Ausschüttung von Glucagon aus dem Pankreas kommen (134, 270). Auf diese Weise würde die direkte Wirkung dieser Hormone mittelbar verstärkt. Glucagon, auf der anderen Seite, führt in intakten Tieren zu einer Induktion, da ausreichende Spiegel an Glucocorticoiden im Blut vorliegen. Modifizieren-

de Einflüsse in der einen oder anderen Richtung können darüberhinaus von allen Faktoren erwartet werden, die mit den Wirkungsmechanismen von Glucocorticoiden (115) und Glucagon, etwa über cAMP (42), in Interaktion treten können. Auf diese Weise könnte die vorgeschlagene Wechselwirkung zwischen Glucagon und Dexamethason auch zum Verständnis der Befunde zur Steuerung der prä- und postnatalen Entwicklung des Harnstoffzyklus beitragen (292).

Natürlich schließt diese Interpretation einiger regulatorischer Aspekte die Teilnahme weiterer Hormone mit völlig andersartigem Wirkungsmechanismus nicht aus. Beispielsweise dürfte Wachstumshormon ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Adaption des Harnstoffzyklus spielen (226).

Die postulierte Rolle des Glucagons als wichtiger Induktor der Harnstoffzyklusenzyme beantwortet auch die Frage, ob der Adaptation des Zyklus eine koordinierte Wirkung auf alle beteiligten Enzyme zugrunde liegt. Eine solche koordinierte Aktion war schon sehr früh diskutiert worden (323), blieb jedoch unter dem Eindruck abweichender Ergebnisse bei einzelnen Enzymen sehr umstritten (2, 55, 77, 325). Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse kann - in Übereinstimmung mit den Befunden von Snodgrass et al. (357) - die Existenz eines einheitlichen Kontrollmechanismus angenommen werden. Zugleich deuten die Ergebnisse jedoch darauf hin, daß hormonelle und nichthormonelle Effekte - analog der Leucin-Wirkung bei der Arginase - in mehr selektiver Art zu Modifikationen der gemeinsamen Hormonantwort führen.

Zum Abschluß sei noch kurz auf die Frage der physiologischen

Bedeutung der hier diskutierten hormonellen Regulation eingegangen. Zweifellos tragen die Ergebnisse dieser Arbeit zum Verständnis der beobachteten Adaption der Harnstoffzyklusenzyme an veränderte Stoffwechselbedingungen, wie Hunger, Wechsel des Proteingehalts der Ernährung etc., bei. Ferner liefern sie einen Ansatzpunkt zum Verständnis tageszeitlicher Aktivitätsschwankungen, wie sie etwa von der Argininosuccinat Synthetase beschrieben wurden (162).

Während jedoch Schimke in seinen frühen Untersuchungen noch von der Annahme einer direkten Abhängigkeit der Harnstoffsynthese von den Aktivitätsspiegeln der Zyklusenzyme ausging (323), wurde bald klar, daß ein solch einfacher Zusammenhang nicht existiert (3, 223, 293). Es muß vielmehr davon ausgegangen werden, daß die wirksame Aktivität der Enzyme in der Zelle sehr stark von derjenigen abweicht, die unter optimalen Testbedingungen gemessen werden kann, und in vielfältiger Weise reguliert wird (293). Da nach neuesten Erkenntnissen zumindest die mitochondrialen Enzyme höchstwahrscheinlich als Enzymkomplexe und außerdem in Konzentrationen vorliegen, die denen der beteiligten Metabolite des Zyklus gleichkommen (293), ergeben sich hier völlig neue Aspekte hinsichtlich der Kinetik der Katalyse als auch der allosterischen Regulation.

Es bleibt somit zukünftigen Untersuchungen überlassen, die Auswirkungen und Bedeutung der erhöhten Enzymspiegel bei Stoffwechselzuständen chronisch erhöhter Harnstoffausscheidung zu bestimmen. Besonderes Gewicht kommt hierbei einer genauen Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen den Enzymspiegeln

und den komplexen metabolischen Regulationsmechanismen zu, die für die schnelle Modulation der Harnstoffsynthese verantwortlich scheinen (177, 234).

5. ABSCHLIESSENDE BETRACHTUNGEN

5.1. Vergleich von Perifusion und diskontinuierlicher Kultur

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten die Eigenschaften perifundierter und diskontinuierlich kultivierter Hepatozyten jeweils gesondert im Kontext der untersuchten Phänomene verglichen und diskutiert wurden, soll hier versucht werden, eine zusammenfassende Bewertung des hier entwickelten Kultursystems der Perifusion zu geben. Bei dieser Gegenüberstellung erscheint es angebracht, methodologische und zellphysiologische Gesichtspunkte getrennt zu betrachten.

In experimenteller Hinsicht zeigt das entwickelte Perifusionssystem viele der Vorteile, die von einem System mit kontinuierlicher Medienzufuhr erwartet werden können.

Hervorzuheben ist einmal die größere Ähnlichkeit parallel geführter Kulturen, da divergente Entwicklungen durch die Versorgung verschiedener Kulturkammern mit ein und demselben Medium weitgehend unterdrückt werden können. Auch die Möglichkeit, nacheinander Proben aus einer Kulturkammer entnehmen zu können, erhöht die Homogenität der Meßwerte, so daß vor allem zeitliche Abläufe ohne übermäßige Schwankungen bestimmbar sind. Demgegenüber läßt sich bei der diskontinuierlichen Kultivierung in Petrischalen häufig beobachten, daß sich die einzelnen getrennten Kulturen mit zunehmender Dauer immer stärker auseinanderentwickeln. Dies ist besonders ausgeprägt nach ungefähr sechs Tagen, wenn die Hepatozyten unter den Bedingungen dieses Systems

an die Grenze ihrer Lebensfähigkeit gelangen.

Während so in der Perifusion zeitlich aufeinanderfolgende Ereignisse einfach und relativ genau erfaßt werden können, ist es nur mit erheblichem Aufwand möglich, umfangreiche Parallelansätze zu bewältigen, wie sie etwa bei Untersuchungen der Konzentrationsabhängigkeit einer Wirkung oder der wechselseitigen Beeinflussung mehrerer Agentien unumgänglich sind. Hierzu kommt eine - verglichen mit dem gewöhnlichen Kulturs ystem - größere Anfälligkeit gegenüber Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen, die die Handhabung ebenfalls erschwert.

Der wohl bedeutsamste Vorteil der Perifusion gegenüber der diskontinuierlichen Kultivierung ist die Konstanz des extrazellulären Milieus, die mit den Messungen der Aminosäurespiegel im Kulturmedium eindeutig demonstriert werden konnte. Hierdurch werden für die einzelnen Versuche sehr übersichtliche Verhältnisse geschaffen, da während des Versuchsablaufs steady-state Konzentrationen auch für infundierte Hormone und andere Agentien angenommen werden können. Einen eindrucksvollen Beleg hierfür lieferten die Untersuchungen zur hormonellen Regulation der Harnstoffzyklusenzyme, die an der Perifusion zu einem klaren, unumstrittenen Resultat führten, an der diskontinuierlichen Kultur hingegen viele Fragen offenließen. Zwar konnte die unterschiedliche Effektivität der Hormone an beiden Systemen nicht vollständig erklärt werden, doch scheint die schwache Hormonantwort von diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten zumindest teilweise (vgl. Abschn. 4.2.2.4.) das Ergebnis von Störungen sein, deren Ursache in den parallellaufenden

Veränderungen des extrazellulären Milieus zu suchen ist.

Vom Standpunkt der Zellphysiologie aus erweist sich die kontinuierliche Versorgung der Zellen ebenfalls als bedeutsame Verbesserung der Kulturbedingungen. Dies kommt besonders in der Langlebigkeit und relativen Stabilität der perifundierten Hepatozyten zum Ausdruck. Bei näherer Betrachtung der zellbiologischen und biochemischen Entwicklungen zeigen sich jedoch neben solchen offensichtlichen Unterschieden auch bemerkenswerte Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenartig kultivierten Zellen.

Zweifellos gewährleistet das perifundierte System eine optimalere nutritive Versorgung und Entsorgung (Verdünnung toxischer Stoffwechselprodukte) der kultivierten Zellen. Hieraus resultieren beispielsweise die beschleunigte Adaptation der isolierten Zellen an die in vitro Bedingungen, eine umfassende Erholung der Zellen vom 'Trauma' der Isolation, eine raschere Ausbildung eines neuen Gewebeverbandes und damit einhergehend höhere Stoffwechselleistungen. Es fällt jedoch auf, daß diese Unterschiede - und gleichfalls die längere Lebensdauer - im wesentlichen quantitativer Natur sind, während viele der eigentlich qualitativen Ergebnisse an beiden Kultursystemen dieselben sind. Besonders eindrucksvoll wird dies an Hand der Verschiebungen der Aminosäurezusammensetzung im Kulturmedium und der intrazelluären Lipidakkumulation verdeutlicht. Auch die Befunde zur hormonellen Regulation der Glutamin-Synthetase und der Enzyme des Harnstoffzyklus sprechen insgesamt für diese Interpretation, obwohl die Ursachen für

einige wenige Abweichungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt werden konnten.

Die Ursachen für die qualitative Ähnlichkeit der verschieden kultivierten Hepatozyten dürften in der grundsätzlich gleichartigen Umgebung der Zellen begründet sein.

Bedeutsam in dieser Hinsicht ist sicher die völlig gleiche Einbettung der Zellen in den Monolayerverband, von der die Entwicklung der Hepatozyten in der Kultur wahrscheinlich wesentlich beeinflußt wird. Von gleicher Bedeutung für die Stoffwechselcharakteristik dürfte die weitgehend ähnliche hormonelle Umgebung sein, die während der ersten zehn bis zwanzig Stunden in beiden Kultursystemen herrscht. Der prägende Einfluß des Mediums selbst dürfte ebenfalls zu Beginn der Kultivierung ziemlich ähnlich sein, danach jedoch in den verschiedenen Kultursystemen sehr unterschiedlich ausfallen.

Möglicherweise ist dies der Grund dafür, daß die Hepatozyten im diskontinuierlichen System am zweiten Kulturtag die größte Übereinstimmung mit den perifundierten Zellen zeigen. Während die diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten im weiteren Verlauf infolge ihrer Adaptation an die suboptimale und wechselnde hormonelle und nutritive Situation gewisse leberspezifische Funktionen mehr oder weniger schnell verlieren, dürfte die fortdauernde Konstanz dieser Milieufaktoren in der Perifusion die anhaltende Stabilität von perifundierten Hepatozyten bedingen. Ausdruck solcher erhöhter Stabilität und Ausgewogenheit ist auch die Tatsache, daß perifundierte Hepatozyten offensichtlich über lange Zeit eine positive Stickstoffbilanz aufrechter-

halten, was als einer der wenigen qualitativen Unterschiede angesehen werden kann.

Die Charakteristika der beiden Kultursysteme und ihre Eignung als Modellsysteme lassen sich nach diesen Ausführungen wie folgt zusammenfassen: Diskontinuierlich kultivierte und perifundierte Hepatozyten sind sich in ihren metabolischen und regulatorischen Eigenschaften qualitativ sehr ähnlich, die Leistungsfähigkeit perfundierter Zellen ist jedoch beträchtlich erhöht und zeichnet sich ferner durch ihre anhaltende Stabilität aus. Während somit regulatorische Studien mit beiden Kultursystemen zu grundsätzlich ähnlichen Ergebnissen führen, erleichtert die Perifusion der Charakterisierung regulatorischer Phänomene und Ereignisse, da sie hier deutlicher ausgeprägt sind und vor dem Hintergrund überschaubarer und kontrollierter extrazellulärer Einflüsse in Erscheinung treten.

5.2. Primäre Leberzellkulturen als Modellsysteme für die hormonale Regulation des Leberstoffwechsels

Die Untersuchungen zur hormonellen Regulation der Glutamin-Synthetase und der Enzyme des Harnstoffzyklus veranschaulichen klar, daß mit den Primären Hepatozytenkulturen allgemein - und mit der Perifusion im besonderen - geeignete Modellsysteme zur Verfügung stehen, mit deren Hilfe Wechselwirkungen der verschiedensten regulatorischen Faktoren aufgeklärt und Einblick in die Regulation der Enzymspiegel auf zellulärer Ebene erlangt werden kann. Diese Bewertung deckt sich mit dem Urteil der meisten

Autoren, von denen parallel zur vorliegenden Arbeit Befunde zur hormonellen Kontrolle anderer Enzyme und Stoffwechselleistungen veröffentlicht wurden. Bei den Enzymen sind hier Untersuchungen über die Tyrosin Aminotransferase (111, 245), die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (269), die Glucokinase (164, 333), die Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase (202) und das P 450 (130, 242, 271) zu nennen. In bezug auf die Stoffwechselleistungen sei der Fülle der Arbeiten wegen auf eine vollständige Auflistung verzichtet und nur auf wenige wichtige Untersuchungen verwiesen (78, 121, 301, 364).

Die somit unbestrittene prinzipielle Eignung dieses Modellsystems für regulatorische Studien sagt jedoch zunächst nur wenig aus über dessen Besonderheiten und vor allem über den Grad der Übereinstimmung zwischen der Situation in vitro und in vivo. Aus diesem Grund sollen hier noch einige allgemeine Betrachtungen angefügt und diese zu verschiedenen experimentellen Befunden in Beziehung gesetzt werden.

Ausgangspunkt ist die Überlegung, daß die isolierten und kultivierten Hepatozyten von den gesamten endokrinen Einflüssen des intakten Organismus abgeschnitten sind. Sie sollten daher eine Überlagerung gewisser Auswirkungen zeigen, die nach Entfernen einzelner Hormondrüsen an der Leber manifest werden. Vor diesem Hintergrund erstaunt es wenig, wenn die kultivierten Hepatozyten ohne adäquate hormonelle Reize viele leberspezifische Stoffwechselleistungen und Enzymaktivitäten verlieren, eine Tatsache, die von verschiedener Seite kritisiert wurde (159). Solche Adaptationsvorgänge an die in vitro Bedingungen

sind jedoch höchstwahrscheinlich nicht die einzige Konsequenz aus dem Verlust physiologischer Steuerungsmechanismen, vielmehr dürfte zusätzlich die Wirksamkeit der Hormone selbst auf der Ebene der Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung betroffen sein.

Es ist seit längerer Zeit bekannt und inzwischen gut dokumentiert, daß Zellen die Fähigkeit besitzen, Veränderungen in den einwirkenden Hormonkonzentrationen mit Änderungen der Zahl und/oder der Affinität ihrer Rezeptoren zu beantworten (Übersichtsartikel siehe (56, 57, 368)). Hierzu gehören Phänomene wie negative und - seltener - positive Kooperativität, Desensibilisierung oder Refraktorität und der Verlust von Rezeptoren, sogenannte 'down regulation'. Solche Änderungen können sowohl durch das homologe Hormon oder auch durch andere Hormone bewirkt werden. Beispiele sind etwa die 'down regulation' der Insulin-Rezeptoren der Leber (62, 160) und die reziproke Relation zwischen Somatotropinrezeptoren und Insulinkonzentration (23).

Die Arbeit von Blackard et al. (37) über die Regulation der Insulinrezeptoren zeigt, daß diese Mechanismen auch an kultivierten Hepatozyten wirksam sind. Höchstwahrscheinlich sind die Auswirkungen gerade hier besonders drastisch, da häufig unphysiologisch hohe Hormonkonzentrationen eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden ferner Beobachtungen gemacht, die auf eine Beeinflussung der Sensitivität gegenüber Wachstumshormon durch Insulin hindeuten könnten (vgl. Abschnitt 4.2.1.3.). Auch die Refraktorität, die die Wirkung des Wachstumshormons begleitet bzw. dieser nachfolgt, ist ein Beispiel für die Fortdauer und Wirksamkeit derartiger regulatorischer Phänomene.

Auf Grund solcher Mechanismen ist zumindest die quantitative Verschiebung des Rezeptorprofils der kultivierten Hepatozyten sehr wahrscheinlich. Es ist darüber hinaus denkbar, daß auf diese Weise auch mehr qualitative Änderungen eintreten. So könnte die Abwesenheit oder einseitige Zufuhr von Sexualhormonen zu tiefgreifenden Änderungen im Rezeptormuster und damit der regulatorischen Eigenschaften führen, ähnlich wie dies durch entsprechende Eingriffe auch in vivo erreicht werden kann (12, 288, 289).

In welchem Umfang Entwicklungen dieser Art die Regulation einzelner Stoffwechselbereiche beeinflussen, läßt sich allgemein und ohne experimentelle Erfahrung nur bedingt abschätzen. So dürfte es unwahrscheinlich sein, daß es auf Grund derartiger Verschiebungen zum totalen Ausfall gewisser hormoneller Wirkungen kommt, eine Über- oder Unterbewertung der Rolle einzelner Hormone innerhalb eines komplexen Wirkungsgefüges erscheint hingegen eher möglich. Obwohl hierdurch die grundsätzliche Bedeutung der Primärkulturen für Untersuchungen der hormonellen Regulation kaum geschmälert werden dürfte, muß diese Tatsache doch bei Vergleichen von Hepatozytenkulturen untereinander und insbesondere bei Rückschlüssen auf die Verhältnisse am Ganztier berücksichtigt werden.

5.3. Die Leberparenchymzelle in Primärkultur - eine differenzierte Zelle?

An dieser Stelle soll noch auf einige Fragen in bezug auf den Differenzierungsgrad der kultivierten Hepatozyten und dessen Erhaltung eingegangen werden, denen im Zusammenhang mit regulatorischen Studien nicht geringe Bedeutung zukommt. In den vorstehenden Abschnitten der Diskussion wurde verschiedentlich hervorgehoben, daß eine anhaltende Stabilität gewisser leberspezifischer Stoffwechselfunktionen nur in der Perifusion erreicht werden kann, während im diskontinuierlichen Kultursystem schon relativ frühzeitig mit einem Absinken der Leistungsfähigkeit und parallel dazu entsprechender Enzymspiegel gerechnet werden muß. Dies gilt streng genommen nur für die hier untersuchten Teilbereiche des Stickstoffstoffwechsels und kann nicht ohne weiteres generalisiert werden. So scheint beispielsweise die Gluconeogenese unter den beschriebenen Bedingungen auch in der Perifusion wesentlich weniger stabil zu sein.

Der Verlust leberspezifischer Funktionen wurde in dieser Arbeit interpretiert als aktiver Adaptationsprozeß an suboptimale Bedingungen der *in vitro* Kultur. Damit wird diese Entwicklung in eine Reihe mit normalen regulatorischen Phänomenen wie Deinduktion oder Repression gestellt und wird als grundsätzlich (d.h. zumindest im Anfangsstadium) reversible Änderung des funktionalen Zustandes der Zellen im Sinne von Tsanev und Sendov (377) angesehen. Im Gegensatz zu der hier vertretenen Ansicht wurden derartige "degenerative" Veränderungen als Dedifferenzierung angesprochen (159), einem Terminus, der in mehr

unpräzisem Sinne häufig von Kritikern der Primärkultivierung adulter Hepatozyten verwendet wird.

In seiner strengen Bedeutung beschreibt dieser Begriff jedoch eine Änderung des zellulären Typus (wiederum im Sinne von Tsanev und Sendov (377)) in Richtung auf eine eher multipotente Zelle. Es genügt im Falle von Leberzellen insofern nicht, das Verschwinden differenzierter Funktionen festzustellen, um ein zelluläres Geschehen als Dedifferenzierung bezeichnen zu können, es muß hingegen der Nachweis darüber geführt werden, daß parallel dazu Eigenschaften auftreten, die einem eher fötalen Status zuzurechnen sind. Als solche kommen etwa die Produktion von α-Fetoprotein in Frage, oder die Expression fötaler Isoenzyme.

Die Frage, ob die kultivierten Hepatozyten auch nach längerer Kultivierung trotz des fortschreitenden Rückgangs leberspezifischer Funktionen differenzierte Leberparenchymzellen darstellen, oder ob hier tatsächlich eine Dedifferenzierung stattfindet, ist somit gleichbedeutend mit der Frage nach der Präsenz fötaler Eigenschaften in Primärkulturen von Hepatozyten.

Die Expression fötaler Eigenschaften - wenn nicht gar eines transformierten Phänotypus - konnte bislang bei allen primären Zellinien, die von adulten Hepatozyten abgeleitet worden waren, nachgewiesen werden (189, 282, 290, 385, 396). Auf Grund detaillierter Untersuchungen wurde vermutet, daß im Falle von Leberzellen eine wechselseitige Abhängigkeit besteht zwischen dem Verlust differenzierter Funktionen, dem Erscheinen fötaler Eigenschaften und dem Eintritt in mitotische Aktivität (218) (vgl. auch Tsanev (378).

Auch von Primärkultursystemen, die dem hier verwendeten eher vergleichbar sind, liegen inzwischen Informationen vor. So wurde von Sirica et al. (352) die Ausprägung fötaler Eigenschaften parallel zu einer Zunahme der DNS-Synthese beschrieben. Obwohl die Autoren den geringen mitotischen Index betonten, ist es fraglich, ob hier wirklich phänotypische Änderungen ohne mitotische Aktivität auftreten. Dagegen spricht nicht nur das Ausmaß der α-Fetoproteinproduktion und der DNS-Synthese in diesen Untersuchungen, sondern auch die Irreversibilität der Entwicklung, wie durch die Befunde von Leffert et al. (195) an einem ungewöhnlichen, proliferationsfähigen Kultursystem nahegelegt wird. Zwar findet in diesem System (194) eine hohe Selektion zugunsten proliferierender Hepatozyten statt, doch zeigen sich hier reversible Übergänge zwischen Differenzierungsmustern, die als "Retrodifferenzierung" bezeichnet wurden (379). Die dabei auftretenden Differenzierungsvorgänge in der Spätphase der Kultivierung betonen die enge Beziehung zwischen differenziertem Zustand und Abwesenheit mitotischer Aktivität.

Somit sprechen auch die Ergebnisse an nicht-subkultivierten Monolayerkulturen adulter Hepatozyten für die Ansicht, daß Dedifferenzierungen an mitotische Aktivität und Proliferation gebunden sind. In ähnlicher Weise können die Befunde von Grisham et al. (124) interpretiert werden, wonach unter analogen experimentellen Bedingungen epithelial wachsende Zellklone nicht von Hepatozyten mit ausgeprägt parenchymaler Morphologie abstammen. In nicht-proliferierender Monolayerkultur stellt daher der Rückgang differenzierter Leistungen einen "normalen" Adaptations-

vorgang dar, der durch angemessene hormonelle und nutritive Einflüsse aufhebbar bzw. umkehrbar sein sollte.

Es soll in diesem Zusammenhang nicht auf die noch offene Frage eingegangen werden, ob differenzierte Hepatozyten - mit Ausnahme solcher höherer Ploidität (53) - allgemein noch die Fähigkeit besitzen, eine Mitose zu durchlaufen, oder ob dies erst teilweise differenzierten Zellen, sogenannten Stammzellen, vorbehalten bleibt (vgl. hierzu Tsanev (378), Grobstein (126) und Grisham et al. (124)) - Ungeachtet der mitotischen Potenz müssen jedoch in jedem Fall ganz spezifische hormonelle und nutritive Bedingungen (193) und Voraussetzungen auch hinsichtlich der extrazellulären Matrix (vgl. (354)) erfüllt sein, ehe es zum Eintritt der Hepatozyten in die S-Phase kommt. Hierzu zählen allgemein hohe Konzentrationen von Serum, niedrige Zelldichte und proteolytische Andauung der Plasmamembran. Der Ausschluß solcher Einflüsse ist somit Vorbedingung für die Erhaltung eines differenzierten Zustandes. Dieser Forderung scheint die Perifusion, trotz einer ständigen, wenn auch geringen Zufuhr von Serum, eher zu entsprechen als das diskontinuierliche Kultursystem; eine eindeutige Klärung muß jedoch gezielten Experimenten in dieser Richtung überlassen bleiben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Für die Kultivierung von Leberparenchymzellen adulter Ratten wurde ein Perifusionssystem entwickelt, das anstelle der üblichen periodischen Medienwechsel (diskontinuierliches System) eine kontinuierliche Versorgung der Zellmonolayer mit Kulturmedium ermöglicht. Dieses System zeichnet sich dadurch aus, daß ein weitgehend konstantes und kontrollierbares extrazelluläres Milieu aufrechterhalten werden kann. Die einfache Übertragung der üblichen Kulturbedingungen auf die Perifusion führte zu einer enormen Anhäufung intrazellulärer Lipidtröpfchen und frühzeitiger nekrotischer Degeneration der Hepatozyten. Diese Entwicklung konnte durch Anhebung der Serum-Albumin-Konzentration stark verzögert werden. Ferner wurde ein Kulturmedium ausgearbeitet, das spezielle Anforderungen kultivierter Hepatozyten berücksichtigt und die Erhaltung von Stoffwechselleistungen und entsprechenden Enzymaktivitäten aus dem Stickstoffmetabolismus, sowie die Fortdauer regulatorischer Eigenschaften begünstigt.

Ein Vergleich der verschiedenartig kultivierten Hepatozyten an Hand morphologischer und biochemischer Kriterien führte zu folgendem Ergebnis:

1) Die Perifusion beschleunigt die Ausformung der Zellmonolayer und fördert die Langzeit-Kultivierung metabolisch aktiver und hormonsensitiver Hepatozyten.
2) Die Harnstoffsynthese perifundierter Hepatozyten erreicht bereits nach einem Tag vergleichbare Raten wie im Ganztier und liegt damit 2 - 3 fach höher als bei diskontinuierlich kultivierten Hepatozyten. Sie ist bemerkenswert stabil und kann durch erhöhtes Substratangebot gesteigert werden.
3) Glucagon verdoppelt die Harnstoffproduktion in beiden Systemen, führt jedoch nur in der Perifusion zu einer ausgeprägten Konditionierung der Zellen bezüglich der Synthese von Harnstoff.
4) In beiden Kultursystemen zeigen die Hepatozyten eine ähnliche Präferenz zur Metabolisierung bestimmter Aminosäuren, die gewisse Merkmale einer homöostatischen Regulation aufweist.

5) Die Stickstoffbilanz diskontinuierlich kultivierter Hepatozyten ist negativ, kann jedoch durch Gabe von Dexamethason umgekehrt werden. Bei perifundierten Hepatozyten ist sie stets und über längere Zeit hinweg positiv.

Die beiden Kultursysteme wurden für Untersuchungen zur hormonalen Regulation der Glutamin-Synthetase und der Enzyme des Harnstoffzyklus herangezogen. Während im Falle der Glutamin-Synthetase an beiden Systemen weitgehend ähnliche Resultate erhalten wurden, konnte eine ausgeprägte Hormonantwort bei den Enzymen des Harnstoffzyklus nur im perifundierten System beobachtet werden.

Die Untersuchungen zur hormonalen Regulation der Glutamin-Synthetase erbrachten folgende Ergebnisse:

1) Die Aktivität der Glutamin-Synthetase sinkt bei diskontinuierlicher Kultivierung zwischen 12 und 20 Stunden nach Absetzen der Zellen stark ab und stabilisiert sich auf einem niedrigeren Niveau. Bei früh einsetzender Perifusion (4 Stunden) bleibt ein wesentlich höheres Aktivitätsniveau erhalten.
2) Dieser Aktivitätsverlauf kann durch Einzelgaben einer Vielfalt von Hormonen nicht oder nur ganz geringfügig (Dexamethason und Insulin) beeinflußt werden.
3) Die gleichzeitige Anwesenheit von Dexamethason und Human-Wachstumshormon führt vom tieferen Niveau aus zu einer Aktivitätssteigerung von 60 - 70 % innerhalb von 24 Stunden, und von mehr als 100 %, wenn die Hormone nach 10 Stunden erneut zugesetzt werden. Vom höheren Niveau aus ist eine Steigerung nur begrenzt möglich.
4) Die Wirkung dieser Hormonmischung wird durch zusätzliche Gabe von Trijodothyronin und Insulin weiter gesteigert. Andere Kombinationen dieser Hormone sind unwirksam.
5) Die Wirkung des Human-Wachstumshormons in der Kombination mit Dexamethason wird über somatogene Rezeptoren der Hepatozyten vermittelt, da sie durch Schweine-Wachstumshormon ebenfalls hervorgerufen werden kann, nicht jedoch durch Prolactin.
6) Die gemeinsame Wirkung von Dexamethason und Wachstumshormon auf die Glutamin-Synthetase tritt nur während des zweiten

und dritten Kulturtages auf. Im Gegensatz hierzu ist eine Induktion der Tyrosin Aminotransferase durch Dexamethason jederzeit möglich.

7) Die Aktivitätssteigerung tritt nach einer lag-Phase von 6 - 8 Stunden ein.
8) Eine Präinkubation der Hepatozyten mit Dexamethason führt zu einer verkürzten lag-Phase, während eine Präinkubation mit Wachstumshormon eine Steigerung der Stimulationsgeschwindigkeit bewirkt.
9) Anwesenheit von Cycloheximid oder Puromycin während der Voinkubation verhindert diese Wirkung des Dexamethasons vollständig, die Wirkung des Wachstumshormons hingegen wird nur teilweise beeinflußt.
10) Ein Einfluß der extrazellulären Glutamin-Konzentration auf den basalen Aktivitätsverlauf und die hormonelle Stimulation kann nicht beobachtet werden.

Bei den Enzymen des Harnstoffzyklus wurden - am perifundierten System - die folgenden Resultate erhalten:

1) Glucagon steigert die Enzymaktivitäten zwischen 15 und 60 % innerhalb von 24 Stunden.
2) Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Dexamethason wird die Glucagonwirkung potenziert, besonders bei der Argininosuccinat Synthetase und der Argininosuccinat Lyase. Dexamethason selbst zeigt nur eine geringe Wirkung.
3) Die Wirkung von Glucagon kann - besonders in Gegenwart von Dexamethason - auch durch Dibutyryl-cAMP hervorgerufen werden, während Adrenalin unwirksam bleibt.
4) Alle Aktivitätssteigerungen können durch Cycloheximid verhindert werden.
5) Die stimulierende Wirkung von Glucagon auf die Arginaseaktivität wird durch zunehmende extrazelluläre Konzentrationen an Leucin in steigendem Maße vermindert.

Aus diesen Befunden und einigen Hinweisen aus der Literatur wurden verschiedene mutmaßliche Charakteristika der Wirkungen und Interaktionen der genannten Hormone abgeleitet. Ferner wurde die mögliche physiologische Bedeutung dieser hormonellen Kontrollmechanismen für den Stickstoffstoffwechsel diskutiert.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abercrombie, M., Dunn, G. A. & Health, J. P. (1976) in: Contractile Systems in Non-Muscle Tissue (Perry, S. V., Margareth, A. & Adelstein, R. S., eds.) S. 3 - 11, North Holland, Amsterdam.

2. Aebi, H. (1969) in: Protein Calorie Malnutrition (von Muralt, A., ed.) S. 19 - 37, Springer Verlag, Heidelberg.

3. Aebi, H. (1976) in: The Urea Cycle (Grisolia, S., Báguena, R. & Mayor, F., eds.) S. 275 - 296, John Wiley, New York.

4. Aikawa, T., Matsutaka, H., Yamamoto, H., Okuda, T., Ishikawa, E., Kawano, T. & Matsumura, E. (1973) J. Biochem. 74, 1003 - 1017.

5. Albertson-Wikland, K. & Isaksson, O. (1976) Metabolism 25, 747 - 759.

6. Alexander, R. W. & Grisham, J. N. (1970) Lab. Invest. 22, 50 - 62.

7. Allen, T. D., Iype, P. T. & Murphy, M. J., Jr. (1970) In Vitro 12, 837 - 844.

8. Alwen, J. & Gallai-Hatchard, J. J. (1972) J. Cell Sci. 11, 249 - 260.

9. Alwen, J. & Lawn, A. M. (1974) Exp. Cell Res. 89, 197 - 205.

10. Arad, G., Freikopf, A. & Kulka, R. G. (1976) Cell 8, 95 - 101.

11. Arad, G. & Kulka, R. G. (1978) Biochim. Biophys. Acta 544, 153 - 162.

12. Aragona, C., Bohnet, H. G. & Friesen, H. G. (1976) Endocrinology 99, 1017 - 1022.

13. Ashida, K. & Harper, A. E. (1961) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107, 151.

14. Ayala, E. & Canonico, P. G. (1975) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149, 1019 - 1022.

15. Badawy, A. A.-B. (1977) Life Sci. 21, 755 - 768.

16. Baker, R. (1944) Quant. J. Micr. Sci. 85, 2 - 16.

17. Barnes, P. R., Youngberg, D. & Kitos, P. A. (1971) J. Cell. Physiol. 77, 135 - 144.

18. Barth, C., Willershausen, B., Walther, B. & Weis, E. (1977) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 211.

19. Barth, C. & Hillmar, J. (1978) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 722 - 734.

20. Barth, C. (1979) persönl. Mitteilung.

21. Baxter, J. D. & Rousseau, G. G. (1979) in:Glucocorticoid Hormone Action (Baxter, J. D. & Rousseau, G. G., eds.) S. 1 - 24, Springer Verlag, Heidelberg.

22. Baxter, J. D. & Rousseau, G. G., eds. (1979) Glucocorticoid Hormone Action, Springer Verlag, Heidelberg.

23. Baxter, R. C. & Turtle, J. R. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 350 - 357.

24. Baxter, R. C. & Turtle, J. R. (1978) Metabolism 27, 503 - 506.

25. Becher, H., Mecke, D., Kleinen. R. & Mertz, D. F. (1974), Klin. Wochenschr. 52, 396 - 397.

26. Bellemann, P., Gebhardt, R. & Mecke, D. (1977) Anal. Biochem. 81, 408 - 415.

27. Bergmeyer, H. U. & Bernt, E. (1974) in Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., ed.) S. 767 - 775, Verlag Chemie, Weinheim.

28. - Ibid. S. 785 - 791.

29. Bernaert, D., Wanson, J. C., Drochmans, P. & Popowski, A. (1977) J. Cell Biol. 74, 878 - 900.

30. Berry, M. N. & Friend, D. S. (1969) J. Cell Biol. 43, 506 - 520.

31. Berry, M. N. (1976) in: Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. M., Söling, H. D. & Williamson, J. R., eds.) S. 131 - 138, North-Holland, Amsterdam.

32. Betheil, J. J., Feigelson, M. & Feigelson, P. (1965) Biochim. Biophys. Acta 104, 92 - 97.

33. Bewsher, P. D. & Ashmore, J. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 431 - 436.

34. Billat, C., Plas, C. & Jacquot, R. (1972) Compt. Rend. 17, 2338 - 2340.

35. Bissell, D. M., Hammaker, L. E. & Meyer, U. A. (1973) J. Cell Biol. 59, 722 - 734.

36. Bissell, D. M. & Billing, B. H. (1979) in: The Liver: Quantitative Aspects of Structure und Function (Preisig, R. & Bircher, J., eds.) Bd. 3, S. 110 - 117, Editio Cantor, Aulendorf.

37. Blackard, W. G., Guzelian, P. S. & Small, M. E. (1978) Endocrinology 103, 548 - 553.

38. Blecher, M. & Hunt, N. H. (1972) J. Biol. Chem. 247, 7479 - 7484.

39. Bonney, R. J., Becker, J. E., Walker, P. R. & Potter, V. R. (1974) In Vitro 9, 399 - 411.

40. Bonney, R. J. & Maley, F. (1975) in: Gene Expression and Carcinogenesis in Cultured Liver (Gerschenson, L. E. & Thompson, E. B., eds.) S. 24 - 45, Academic Press, New York.

41. Borsook, H. & Dubnoff, J. N. (1941) J. Biol. Chem. 141, 717 - 738.

42. Braun, T. & Birnbaumer, L. (1975) in: Comprehensive Biochemistry (Florkin, M. & Stotz, E. H., eds.) Vol. 25, S. 65 - 106, Elsevier, Amsterdam.

43. Braunstein, A. E. (1957) Adv. Enzymol. 19, 335 - 389.

44. Broener, J. E. M. & Van Golde, L. M. G. (1977) Biochim. Biophys. Acta 487, 105 - 114.

45. Bronstein, P. & Ash, J. F. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 74, 2480 - 2484.

46. Brosnan, J. T., Krebs, H. A. & Williamson, D. H. (1970) Biochem. J. 117, 91 - 96.

47. Brosnan, J. T. & Williamson, D. H. (1974) Biochem. J. 138, 453 - 462.

48. Brown, C. L., Houghton, B. J., Sohanni, R. L. & Richards, P. (1972) Clin. Sci. 43, 371 - 376.

49. Bruni, C. & Porter, K. R. (1965) Am. J. Pathol. 46, 691 - 729.

50. Bryla, J., Harris, E. J. & Plumb, J. A. (1977) FEBS Lett. 80, 443 - 448.

51. Buneaux, J. J., Gounelle, J. C. & Raoul, Y. (1971) Hormone Metabolic Res. 3, 94 - 97.

52. Burton, K. (1956) Biochem. J. 62, 315 - 323.

53. Busanny - Caspari, W. (1962) Frankf. Z. Pathol. 72, 123 - 134.

54. Campbell, G. A., Kurcz, M., Marshall, S. & Meites, J. (1977) Endocrinology 100, 580 - 587.

55. Camus, J., Vandermeers-Piret, M. C., Wodon, C. & Christophe, J. (1969) Eur. J. Biochem. 11, 225 - 233.

56. Catt, K. J. & Dufau, M. L. (1977) Ann. Rev. Physiol. 39, 529 - 557.

57. Catt, K. J., Harwood, J. P., Aguilera, G. & Dufau, M. L. (1979) Nature 280, 109 - 116.

58. Ceriotti, G. (1952) J. Biol. Chem. 198, 297 - 303.

59. Chader, G. J. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 1102 - 1105.

60. Chamalaun, R. A. F. M. & Tager, J. M. (1970) Biochim. Biophys. Acta 222, 119 - 134.

61. Chambers, J. W., Georg, R. H. & Bass, A. D. (1968) Endocrinology 83, 1185 - 1192.

62. Chang, K. J., Huang, D. & Cuatrecasas, P. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun, 64, 566 - 573.

63. Chapman, G. S., Jones, A. L., Meyer, U. A. & Bissell, D. M. (1973) J. Cell Biol. 59, 735 - 747.

64. Chappell, J. B., Mc Givan, J. D. & Mendes-Mourao, J. (1977) in: Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. M., Söling, H. D. & Williamson J. R., eds.) S. 11 - 16, North- Holland, Amsterdam.

65. Charles, R. (1968) Dissertation, University of Amsterdam.

66. Chen, J.-L. J., Babcock, D. F. & Lardy, H. A. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2234 - 2238.

67. Chen, R. F. (1967) J. Biol. Chem. 242, 173 - 181.

68. Christiansen, R. Z. & Bremer, J. (1976) Biochim. Biophys. Acta 448, 562 - 577.

69. Christiansen, R. Z., Borrebaek, B. & Bremer, J. (1976) FEBS Lett. 62, 313 - 317.

70. Clark, R. L., Hansen, R. J., Gebhardt, R. & Mecke, D. (1979) Pac. Slope Biochem. Conf., Reno, Nevada, abstract.

71. Cocchi, D., Gil-Ad, I., Panerai, A. E., Locatelli, V. & Müller, E. E. (1976) Life Sci. 19, 825 - 836.

72. Cohen, P. P. & Brown, G. W., Jr. (1960) Comp. Biochem. 2, 161 - 244.

73. Cohnolly, D. T. & Oppenheimer, S. B. (1975) Exp. Cell Res. 94, 459 - 464.

74. Colombo, J. P., Herz, R. & Bircher, J.(1972) Enzyme (Basel) 14, 353 - 365.

75. Crook, R. B. & Tomkins, G. M. (1978) Biochem.J. 176, 47 - 52.

76. Crook, R. B., Louie, M., Deuel, T. F. & Tomkins, G. M. (1978) J. Biol. Chem. 253, 6125 - 6131.

77. Das, K. T. & Waterlow, J. C. (1974) Br. J. Nutr. 32, 353 - 373.

78. Davis, R. A., Engelhorn, S. C., Pangburn, S. H., Weinstein, D. B. & Steinberg, D. (1979) J. Biol. Chem. 254, 2010 - 2016.

79. De Bodo, R. C., Steele, R., Altzuler, N., Dunn, A. & Bishop, J. S. (1963) in: Recent Progr. Hormone Res. 19, 445 - 482.

80. Decad, G. M., Hsieh, D. P. H. & Byard, J. L. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 279 - 287.

81. De Mars, R. (1958) Biochim. Biophys. Acta 27, 435 - 436.

82. Deuel, T. F., Lerner, A. & Albrycht, D. (1973) in: The Enzymes of Glutamine Metabolism (Prusiner, S. & Stadtman, E. R., eds.) S. 129 - 144, Acad. Press, New York.

83. Deuel, T. F., Louie, M. & Lerner, A. (1978) J. Biol. Chem. 253, 6111 - 6118.

84. De Wolf-Peters, C., De Vos, R. & Desmet, V. (1972) Tissue Cell. 4, 379 - 388.

85. Diamondstone, T. I. (1966) Anal. Biochem. 16, 395 - 401.

86. Dickson, J. A. (1971) Exp. Cell Res. 64, 17 - 28.

87. Di Pasquale, A. (1975) Exp. Cell Res. 94, 191 - 215.

88. Donner, D. B., Nakayama, K., Tani, S., Lutz, U. & Sonenberg, M. (1978) J. Biol. Chem. 253, 6717 - 6723.

89. Duda, G. D. & Handler, P. (1958) J. Biol. Chem. 232, 303 - 314.

90. Eagle, H. & Levintow, L. (1965) in: Cells and Tissues in Culture (Willmer, E. N., ed.) S. 277 - 296, Academic Press, New York.

91. Ernest, M. J. & Feigelson, P. (1979) in Glucocorticoid Hormone Action (Baxter, J. D. & Rousseau, G. G., eds.) S. 219 - 241, Springer Verlag, Heidelberg.

92. Exton, J. H., Robison, G. A., Sutherland, E. W. & Park, C. R. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6166 - 6177.

93. Exton, J. H., Friedmann, N., Wong, E. H.-A., Brineaux, J. P., Corbin, J. D. & Park, C. R. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3579 - 3588.

94. Exton, J. H., Robison, G. A. & Sutherland, E. W. (1972) in: Handbook of Physiology (Geiger, S. R., ed.) Sektion 7, Bd. 1, S. 425 - 436, American Physiol. Soc., Washington.

95. Fain, J. N., Kovacev, V. P. & Scow, R. O. (1965) J. Biol. Chem. 240, 3522 - 3529.

96. Feigelson, P. & Killewich, L. A. (1979) in: Glucocorticoid Hormone Action (Baxter, J. D. & Rousseau, G. G., eds.) S. 243 - 251, Springer Verlag, Heidelberg.

97. Fleischer, M. & Wohlfarth-Bottermann, K. E. (1975) Cytobiologie 10, 339 - 365.

98. Flock, E. V., Mann, F. C. & Bollman, J. L. (1951) J. Biol. Chem. 192, 293 - 300.

99. Florén, C.-H. & Nilsson, A. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 520 - 528.

100. Foden, S. & Randle, P. J. (1978) Biochem. J. 170, 615 - 625.

101. Forssmann, W. G. & Ito, S. (1977) J. Cell Biol. 74, 299 - 313.

102. Foster, L. B. & Hochholzer, J. M. (1971) Clinical Chem. 17, 921 - 925.

103. Freikopf, A. & Kulka, R. G. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 1195 - 1200.

104. Freikopf, A. & Kulka, R. G. (1978) Biochem. J. 176, 47 - 52.

105. Friedman, M., Byers, S. O. & Omoto, C. (1956) Am. J. Physiol. 184, 11.

106. Friedmann, N., Exton, J. H. & Park, C. R. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 113 - 119.

107. Gaspodarowicz, D. & Moran, J. S. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45, 531 - 558.

108. Gaspodarowicz, D., Greeburg, G. & Birdwell, C. R. (1978) Cancer Res. 38, 4155 - 4171.

109. Gebhardt, R. (1976) Diplomarbeit, Universität Tübingen.

110. Gebhardt, R., Bellemann, P. & Mecke, D. (1978) Exp. Cell Res. 112, 431 - 441.

111. Gebhardt, R., Schulz, W. & Mecke, D. (1979) Communications of Liver Cells, Falk Symposion 27, abstract 31.

112. Geelen, M. J. H. & Gibson, D. M. (1975) FEBS Lett. 58, 334 - 339.

113. Geelen, M. J. H. & Gibson, D. M. (1976) in: Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. M., Söling, H. D. & Williamson, J. R., eds.) S. 219 - 230.

114. Goldfarb, S., Barber, T. A., Pariza, M. W. & Pugh, T. D. (1978) Exp. Cell Res. 117, 39 - 46.

115. Gorski, J. & Gannon, F. (1976) Ann. Rev. Physiol. 38, 425 - 450.

116. Grammeltveldt, R. & Berg, T. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 977 - 981.

117. Granner, D. K. (1979) in: Glucocorticoid Hormone Action (Baxter, J. D. & Rousseau, G. G., eds.) S. 593 - 611, Springer Verlag, Heidelberg.

118. Graßl, M. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., ed.) 3. Aufl. Bd. II, S. 1727 - 1730 Verlag Chemie, Weinheim.

119. Greengard, O., Sahib, M. K. & Knox, W. E. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 137, 477 - 482.

120. Greenway, C. V. & Oshiro, G. (1972) J. Physiol. 227, 487 - 501.

121. Grieninger, G., Hertzberg, K. M., Liang, T.-Y. & Pindyck, J. (1979) in: The Liver: Quantitative Aspects of Structure and Function (Preisig, R. & Bircher, J., eds.) S. 118 - 125, Editio Cantor, Aulendorf.

122. Grinnell, F. (1976) in: Membranes and Neoplasia: New Approches and Strategies (Marcheri, V. T., ed.) S. 227 - 240, Alan R. Liss Inc., New York.

123. Grinnell, F., Hays, D. G. & Minter, D. (1977) Exp. Cell Rs. 110, 175 - 190.

124. Grisham, J. W., Thal, S. B. & Nagel, A. (1975) in: Gene Expression and Carcinogenesis in Cultured Liver (Gerschenson, L. E. & Thompson, E. B., eds.) S. 1 - 23, Academic Press, New York.

125. Grisolia, S., Báguena, R. & Mayor, F., eds. (1976) The Urea Cycle, John Wiley, New York.

126. Grobstein, C. (1965) in: Cells and Tissues in Culture (Willmer, E. N., ed.) Vol. 1, S. 463 - 488, Academic Press, New York.

127. Guguen, C., Gillouzo, A., Biosnard, M., Le Cam, A. & Bourel, M. (1975) Biol. Gastroenterol. 8, 223 - 231.

128. Gutmann, I. & Bergmeyer, H. U. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., ed.) 3. Aufl., Bd. II, S. 1842 - 1846, Verlag Chemie, Weinheim.

129. Guzelian, P. S. & Bissell, D. M. (1974) Fed. Proc. 33, 345.

130. Guzelian, P. S. & Bissell, D. M. (1976) J. Biol. Chem 251, 4421 - 4427.

131. Guzelian, P. S., Bissell, D. M. & Meyer, U. A. (1977) Gastroenterol. 72, 1232 - 1239.

132. Häussinger, D., Weiss, L. & Sies, H. (1975) Eur. J. Biochem. 52, 421 - 423.

133. Häussinger, D. & Sies, H. (1979) Eur. J. Biochem. 101, 179 - 184.

134. Hahn, H. J. (1976) Z. Gesamte Inn. Med. Grenzgeb. 31, 821 - 828.

135. Ham. R. G. (1974) In Vitro 10, 119 - 129.

136. Handwerger, S. & Sherwood, L. M. (1974) in: Lactogenic Hormones, Fetal Nutrition and Lactation (Josimovich, J. B., ed.) S. 33 - 43, John Wiley, New York.

137. Hanks, J. H. & Wallace, R. E. (1949) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196 - 200.

138. Hanoune, J., Lacombe, M. L. & Pecker, F. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4569 - 4574.

139. Helmreich, E. J. M., Zeuner, H. P., Pfeuffer, T. & Cori, C. F. (1976) Curr. Top. Cell. Regul. 10, 41 - 87.

140. Hems, R., Stubbs, M. & Krebs, H. A. (1968) Biochem. J. 107, 807 - 815.

141. Hems, D. A. (1977) TIBS 2, 241 - 244.

142. Hensgens, H. E. S. J. & Meijer, A. J. (1979) Biochim. Biophys. Acta 582, 525 - 532.

143. Hers, H. G. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45, 167 - 189.

144. Hjalmarson, Å. (1968) Acta Endocrinol. 57, Suppl. 126, 19 - 35.

145. Holzer, H., Mecke, D., Liess, K., Wulff, K., Heilmeyer, L., Jr, Ebner, E., Gancedo, C., Schutt, H., Battig, F. A., Heinrich, P. & Wolf, D. (1969) in: Metabolic Regulation and Enzyme Action (Sols, A. & Grisola, S., eds.) S. 171 - 177, Academic Press, New York.

146. Huang, Y.-Z. & Knox, W. E. (1975) Enzyme (Basel) 19, 314 - 328.

147. Hughes, R. C. (1975) in Essays in Biochemistry (Campbell, P. N. & Aldridge, W. N., eds.) Bd. 11, S. 1 - 36, Academic Press, New York.

148. Husson, A., Gantier, C. & Vaillant, R. (1975) Experientia 31, 1403 - 1404.

149. Hynes, R. O. (1976) Biochim. Biophys. Acta 458, 73 - 107.

150. Ingebretsen, W. R. & Wagle, S. R. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 403 - 410.

151. Ingle, D. J. (1952) J. Endocrinol. 8, XXIII - XXXVII.

152. Iqbal, K. & Ottaway, J. H. (1970) Biochem. J. 119, 145 - 156.

153. Ishikawa, E. (1975) Adv. Enz. Regul. 14, 117 - 136.

154. Iype, P. T. (1971) J. Cell. Physiol. 78, 281 - 288.

155. Jefferson, L. S., Schworer, C. M. & Tolman, E. L. (1975) J. Biol. Chem 250, 197 - 204.

156. John, D. N. & Miller, L. L. (1969) J. Biol. Chem. 244, 6134 - 6142.

157. John, D. N. & Miller, L. L. (1969) Biochem. Pharmacol. 18, 1135 - 1146.

158. Joseph, S. K. & Mc Givan, J. D. (1978) Biochim. Biophys. Acta 543, 16 - 28.

159. Junge, U., Nagamori, S., Brunner, G. & Söling, H. D. (1976) in: Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. M., Söling, H. D. & Williamson, J. R., eds.) S. 201 - 206, North-Holland, Amsterdam.

160. Kahn, C. R., Neville, D. M. & Roth, J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 244 - 250.

161. Kahn, R. H. & Lands, W. E. M.,eds. (1973) Prostaglandins and cyclic AMP, Academic Press, New York.

162. Kato, H., Mizutani-Funahashi, M., Shiosaka, S. & Nakagawa, H. (1978) J. Nutr. 108, 1071 - 1077.

163. Katz, J., Golden, S. & Wals, P. A. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3433 - 3437.

164. Katz, N. R., Nauck, M. A. & Wilson, P. T. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 23 - 29.

165. Kaukel, E., Mundhenk, K. & Hilz, H. (1972) Eur. J. Biochem. 27, 197 - 200.

166. Kelley, D. S. & Potter, V. R. (1978) J. Biol. Chem. 253, 9009 - 9017.

167. Kirk, D. & Moscona, A. (1963) Dev. Biol. 8, 341 - 347.

168. Klebe, R. J. (1974) Nature 250, 248 - 251.

169. Kleinberg, D. L. & Frantz, A. G. (1971) J. Clin. Invest. 50, 1557 - 1568.

170. Kletzien, R. F., Pariza, M. W., Becker, J. E. & Potter, V. R. (1975) Nature 256, 46 - 47.

171. Kletzien, R. F., Pariza, M. W., Becker, J. E. & Potter, V. R. (1976) J. Cell. Physiol. 89, 641 - 646.

172. Knobil, E. & Hochkiss, J. (1964) Ann. Rev. Physiol. 26, 47 - 74.

173. Knook, D. L. & Sleyster, E. C. (1977) in: Kupffer Cells and other Liver Sinusoidal Cells (Wisse, E. & Knook, D. L., eds.) S. 273 - 288, Elsevier, Amsterdam.

174. Knox, W. E., Zupchik, H. Z. & Lin, L. P. (1971) Enzyme (Basel) 12, 88 - 98.

175. Krebs, H. A. & Henseleit, K. (1932) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33 - 66.

176. Krebs, H. A. (1942) Biochem. J. 36, 758 - 767.

177. Krebs, H. A., Hems, R. & Lund, P. (1973) Adv. Enz. Regul. 11, 361 - 377.

178. Kruse, P. F., Jr. & Patterson, M. K., Jr., eds. Tissue Culture, Academic Press, New York.

179. - Ibid. Kapitel 6.

180. Kulka, R. G., Tomkins, G. M. & Crook, R. B. (1972) J. Cell. Biol. 54, 175 - 179.

181. Kulka, R. G. & Cohen, H. (1973) J. Biol. Chem. 248, 6738 - 6743.

182. Kurtz, D. T., Sippel, A. E. & Feigelson, P. (1976) Biochemistry 15, 1031 - 1036.

183. Kurtz, D. T. & Feigelson, P. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4791 - 4795.

184. Kurtz, D. T., Chan, K.-M. & Feigelson, P. (1978) Cell 15, 743 - 750.

185. Labhart, A. (1978) Klinik der inneren Sekretion, Springer Verlag, Heidelberg.

186. Laishes, B. A. & Williams, G. M. (1976) In Vitro 12, 521 - 532.

187. - Ibid. S. 821 - 832.

188. Lamb, R. G., Wood, C. W., Lauda, B. M., Guzelian, P. S. & Fallon, H. J. (1977) Biochim. Biophys. Acta 489, 318 - 329.

189. Lambiotte, M., Susor, W. A. & Cahn, R. D. (1972) Biochimie 54, 1179 - 1187.

190. Lambiotte, M., Vorbrodt, A. & Benedetti, E. L. (1973) Cell Diff. 2, 43 - 53.

191. Langer, T., Strober, W. & Levy, R. (1970) in: Plasma Protein Metabolism (Rothschild, M. & Waldman, T., eds.) S. 483 - 503, Academic Press, New York.

192. Leffert, H. L. (1974) J. Cell. Biol. 62, 767 - 779.

193. Leffert, H. L. & Koch, K. S. (1977) in: Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture (Rothblat, G. H. & Cristofalo, V. J., eds.) Bd. 3, S. 225 - 294, Academic Press, New York.

194. Leffert, H. L., Moran, T., Boorstein, R. & Koch, K. S. (1977) Nature 267, 58 - 61.

195. Leffert, H. L., Moran, T., Sell, S., Skelly, H., Ibsen, K., Mueller, M. & Arias, I. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1834 - 1838.

196. Leibovitz, A. (1963) Am. J. Hyg. 78, 173.

197. Lemonnier, F., Gautier, M., Moatti, N. & Lemonnier, A. (1976) In Vitro 12, 460 - 466.

198. Levay, F., Chambaut, A.-M. & Hanoune, J. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 1385 - 1391.

199. Levine, G. A., Bissell, M. J. & Bissell, D. M. (1978) J. Biol. Chem. 253, 5985 - 5989.

200. Lightbody, H. D. & Kleinman, A. (1939) J. Biol. Chem. 129, 71 - 76.

201. Lin, R. C. & Snodgrass, P. J. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 725 - 734.

202. Lin, R. C. & Snodgrass, P. J. (1977) FEBS Lett. 83, 89 - 92.

203. Lin, R. C. & Snodgrass, P. J. (1979) Fed. Proc. 38, abstract 953.

204. Lin, R. C. (1979) Persönl. Mitteilung.

205. Lison, B. & Dagneli (1935) Bull. Histol. Appl. Physiol. Path. 12, 85.

206. Londos, C., Salomon, Y., Lin, M. C., Harwood, J. P., Schramm, M., Wolff, J. & Rodbell, M. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 3087 - 3094.

207. Loofbourow, J. R., Gould, B. S. & Sizer, I. W. (1949) Arch. Biochem. Biophys. 22, 406.

208. Louie, M., Deuel, T. F. & Morris, H. P. (1978) J. Biol. Chem. 253, 6119 - 6124.

209. Lowenstein, J. M. (1972) Physiol. Rev. 52, 382 - 414.

210. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.

211. Lueck, J. D. & Miller, L. L. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5491 - 5497.

212. Lund, P. (1971) Biochem. J. 124, 653 - 660.

213. Lund, P. & Watford, M. (1976) in: The Urea Cycle (Grisolia, S., Báguena, R. & Mayor, F., eds.) S. 479 - 488, John Wiley, New York.

214. Macieira-Coelho, A. & Arrameas, S. (1973) in: Tissue Culture (Kruse, P. F., Jr. & Patterson, M. K., Jr., eds.) S. 379 - 383, Academic Press, New York.

215. Mackrell, D. J. & Sokal, J. E. (1969) Diabetes 18, 724 - 732.

216. Maclean, N. (1977) The Differentiation of Cells, Edward Arnold, London.

217. Mac Manus, J. P. & Whitfield, J. F. (1969) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132, 409 - 412.

218. Malamud, D. (1971) in: The Cell Cycle and Cancer (Baserga, R., ed.) S. 137 - 151, Marcel Deckker, New York.

219. Mallette, L. E., Exton, J. H. & Park, C. R. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5713 - 5723.

220. Marliss, E. B., Aoki, T. T., Pozefsky, T., Most, A. S. & Cahill, G. F. (1971) J. Clin. Invest. 50, 814 - 817.

220a. Martin, J. B., Tannenbaum, G., Willoughby, J. O., Renaud, L. P. & Brazeau, P. (1975) in: Hypothalamic Hormones (Motta, M., Crosignani, P. & Martini, L., eds.) S. 217 - 235, Academic Press, New York.

221. Mc Conaghey, P. & Sledge, C. B. (1969) Nature 225, 1249 - 1250.

222. Mc Garry, J. D., Robles-Valdes, C. & Foster, D. W. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 4385 - 4388.

223. Mc Givan, J. D., Bradford, N. M. & Chappel, J. B. (1974) Biochem. J. 142, 359 - 364.

224. Mc Givan, J. D. (1976) in: Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules for Metabolic Studies (Tager, J. M., Söling, H. D. & Williamson, J. R., eds.) S. 325 - 328, North-Holland, Amsterdam.

225. Mc Givan, J. D., Bradford, N. M. & Mendes-Mourao, J. (1976) Biochem. J. 154, 415 - 421.

226. Mc Lean, P. & Gurney, M. W. (1963) Biochem. J. 87, 96 - 104.

227. Mc Lean, P. & Novello, F. (1965) Biochem J. 94, 410 - 422.

228. Mc Limans, W. F. (1972) in: Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture (Rothblat, G. H. & Cristofalo, V. J., eds.) Bd. II, S. 137 - 169, Academic Press, New York.

229. Mecke, D. & Holzer, H. (1966) Biochim. Biophys. Acta 122, Acta 122, 341 - 351.

230. Mecke, D., Wulff, K., Liess, K. & Holzer, H. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 452 - 458.

231. Mecke, D. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., ed.) 3. Aufl., Bd. II, S. 1763 - 1766.

232. Mecke, D. (1976) Persönl. Mitteilung.

233. Meijer, A. J. & Van Woerkom, G. M. (1977) Biochim. Biophys. Acta 500, 13 - 26.

234. Meijer, A. J. (1979) TIBS 4, 83 - 86.

235. Meister, A. (1965) Biochemistry of the Amino Acids Bd. II, S. 696, Academic Press, New York.

236. - Ibid. S. 617 - 636.

237. Mendes-Mourao, J., Mc Givan, J. D. & Chappell, J. B. (1975) Biochem. J. 146, 457 - 464.

238. Mendoza-Figueroa, T., Lopez-Revilla, R. & Villa-Trevino, S. (1979) Cancer Res. 39, 3254 - 3257.

239. Meyer, U. A. & Althaus, F. R. (1979) in: The Liver: Quantitative Aspects of Structure and Function (Preisig, R. & Bircher, J., eds.) Bd. 3, S. 126 - 134, Editio Cantor, Aulendorf.

240. Michal, G., Woschee, M. & Wanderwald, P. (1971) Life Sci. 10, 841 - 853.

241. Michalopoulos, G. & Pitot, H. C. (1975) Exp. Cell. Res. 94, 70 - 78.

242. Michalopoulos, G., Sattler, G., Sattler, C. & Pitot, H. C. (1976) Am. J. Pathol. 85, 755 - 770.

243. Michalopoulos, G., Sattler, G. L. & Pitot, H. C. (1976) Life Sci. 18, 1139 - 1144.

244. Michalopoulos, G., Sattler, G. L., O'Connor, L. & Pitot, H. C. (1978) Cancer Res. 38, 1866 - 1871.

245. Michalopoulos, G., Sattler, G. L. & Pitot, H. C. (1978) Cancer Res. 38, 1550 - 1555.

246. Michalopoulos, G., Biles, C., Strom, S. C. & Russel, F. (1979) in: The Liver: Quantitative Aspects of Structure and Function (Preisig, R. & Bircher, J., eds.) Bd. 3, S. 135 - 146, Editio Cantor, Aulendorf.

247. Miettinen, A., Virtanen, I. & Linder, E. (1978) J. Cell Sci. 31, 341 - 353.

248. Miller, J. P., Shuman, D. A., Scholten, M. B., Dimmitt, M. K., Stewart, C. M., Khwaja, T. A., Robins, R. K. & Simon, L. N. (1973) Biochemistry 12, 1010 - 1016.

249. Miller, L. L. (1960) Nature 185, 248.

250. Miller, L. L. (1961) Recent Progr. Hormone Res. 17, 539.

251. Miller, L. L. & Griffin, E. F. (1973) in: Isolated Liver Perfusion and its Application (Bartosek, I., Guaitani, A. & Miller, L. L., eds.) S. 139 - 145, Raven Press, New York.

252. Miller, L. L. (1979) Persönl. Mitteilung.

253. Miller, R. E. (1975) Diabetes 24, 416, abstract 94.

254. Miller, R. E., Hackenberg, R. & Gershman, (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1418 - 1422.

255. Milman, G., Portnoff, L. S. & Tiemeier, D. C. (1975) J. Biol. Chem. 250, 1393 - 1399.

256. Moldave, K. & Meister, A. (1957) J. Biol. Chem. 229, 463 - 476.

257. Mondon, C. E. & Mortimore, G. E. (1967) Am. J. Physiol. 212, 173 - 178.

258. Morris, J. E. & Moscona, A. A. (1970) Science 167, 1736 - 1738.

259. Moscona, A. A., Moscona, M. H. & Saenz, N. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 61, 160 - 167.

260. Moscona, A. A., ed. (1974) The Cell Surface in Development, John Wiley, New York.

261. Munro, H. N. & Fleck, A. (1966) Meth. Biochem. Anal. 14, 113 - 176.

262. Nakamura, T., Aoyama, K., Kato, S., Tomita, Y., Tanaka, K. & Ishihara, A. (1979) in: Carcino-Embryonic Proteins (Ichmann, F. G., ed.) Bd. II, S. 723 - 728, Elsevier/ North-Holland, Amsterdam.

263. Neupert, G. (1971) Acta Morphol. Acad. Sci. Hung. 19, 247 - 257.

264. Niijima, A. & Fukuda, A. (1973) Jpn. J. Physiol. 23, 497 - 508.

265. Nilsson, M. & Berg, T. (1977) Biochim. Biophys. Acta 497, 171 - 182.

266. Novikoff, A. B. & Shin, W. Y. (1964) J. Microsc. 3, 187 - 206.

267. Nutting, D. F. & Coats, L. J. (1977) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 156, 446 - 451.

268. Nuzum, C. T. & Snodgrass, P. J. (1971) Science 172, 1042 - 1043.

269. Oliver, T., Edwards, A. M. & Pitot, H. C. (1978) Eur. J. Biochem. 87, 221 - 227.

270. Pagliara, A. S., Stillings, S. N., Hover, B., Martin, D. B. & Matschinsky, F. M. (1974) J. Clin. Invest. 54, 819 - 832.

271. Paine, A. J., Williams, L. J. & Legg, R. F. (1979) in: The Liver: Quantitative Aspects of Structure and Function (Preisig, R. & Bircher, J., eds.) Bd. 3, S. 99 - 109, Editio Cantor, Aulendorf.

272. Pariza, M. W., Becker, J. E., Yager, J. D., Jr., Bonney, R. J. & Potter, V. R. (1974) in: Differentiation and Control of Malignancy of Tumor Cells (Nakahara, W., Ono, T., Sigimura, T. & Sugano, H., eds.) S. 267 - 285, Univ. Park Press, Baltimore.

273. Pariza, M. W., Yager, J. D., Goldfarb, S., Gurr, J. A., Yanagi, S., Grossman, S. H., Becker, J. E., Barber, T. A. & Potter, V. R. (1975) in: Gene Expression and Carcinogenesis in Cultured Liver (Gerschenson, L. E. Thompson, E. B., eds.) S. 137 - 167, Academic Press, New York.

274. Pariza, M. W., Kletzien, R. F., Butcher, F. R. & Potter, V. R. (1976) Adv. Enz. Regul. 14, 103 - 115.

275. Patterson, M. K., Jr., & Orr, G. R. (1969) Cancer Res. 29, 1179 - 1183.

276. Patterson, M. K., Jr. (1975) Tissue Culture Association Manual (ed. Biomedical Research Institute, Rockville, Md.) Bd. I, S. 243 - 249.

277. Paul, J. & Fottrell, P. (1963) Biochim. Biophys. Acta 67, 334 - 336.

278. Paul, J. (1980) Zell- und Gewebekultur, Walter de Gruyter, Berlin.

279. Payne, S. G. & Kostyo, J. L. (1970) Endocrinology 87, 1186 - 1193.

280. Pearlstein, E. (1976) Nature 262, 497 - 499.

281. Perissel, B., Charbonné, F., Chessebeuf, M. & Malet, P. (1976) Cell Tiss. Res. 171, 157 - 173.

282. Perske, W. F., Parks, R. E., Jr. & Walker, D. L. (1957) Science 125, 1290 - 1291.

283. Pfeuffer, T. (1979) FEBS. Lett. 101, 85 - 89.

284. Phillips, L. S., Herington, A. C., Karl, I. E. & Daughaday, W. H. (1976) Endocrinology 98, 606 - 614.

285. Pitot, H. C. & Yatvin, M. B. (1973) Physiol. Rev. 53, 228 - 325.

286. Pointer, R. H., Butcher, F. R. & Fain, J. N. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2987 - 2992.

287. Popper, H. & Schaffner, F. (1961) Die Leber, Thieme Verlag, Stuttgart.

288. Posner, B. I., Kelly, P. A. & Friesen, H. G. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 2407 - 2410.

289. Postel-Vinay, M.-C. (1976) FEBS Lett. 69, 137 - 140.

290. Potter, V. R. (1972) Cancer Res. 32, 1998 - 2000.

291. Prusiner, S. & Milner, L. (1970) Anal. Biochem. 37, 429 - 438.

292. Räihä, N. C. (1976) in: The Urea Cycle (Grisolia, S., Báguena, R. & Mayor, F., eds.) S. 261 - 272, John Wiley, New York.

293. Raijman, L. ibid. S. 243 - 253.

294. Raina, P. N. & Rosen, F. (1968) Biochim. Biophys. Acta 165, 470 - 475.

295. Randle, P. J. (1963) Ann. Rev. Physiol. 25, 291 - 324.

296. Ranke, M. B., Stanley, C. A., Rodbard, D., Baker, L., Bongiovanni, A. & Parks, J. S. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 847 - 851.

297. Ranke, M. B., Stanley, C. A., Tenore, A., Rodbard, D., Bongiovanni, A. & Parks, J. S. (1976) Endocrinology 99, 1033 - 1045.

298. Ratner, S. (1955) Methods Enzymol. 2, 356 - 367.

299. Ratner, S. (1973) Adv. Enzymol. 39, 1 - 90.

300. Rémésy, C., Demiqué, C. & Aufrère, J. (1978) Biochem. J. 170, 321 - 329.

301. Richman, R. A., Claus, H. T., Pilkis, S. J. & Friedman, D. L. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3589 - 3593.

302. Riggs, T. R. & Walker, L. M. (1960) J. Biol. Chem. 235, 3603 - 3607.

303. Robison, G. A., Butcher, R. W. & Sutherland, E. W. (1970) in: Fundamental Concepts in Drug Receptor Interactions (Danielli, J. F., Moran, J. F. & Triggle, D. J., eds.) S. 59 - 74, Academic Press, New York.

304. Robison, G. A., Butcher, R. W. & Sutherland, E. W. (1971) Cyclic AMP, Academic Press, New York.

305. Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. L. & Krans, H. M. J. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1877 - 1882.

306. Rognstad, R. (1977) Biochim. Biophys. Acta 496, 249 - 254.

307. Rose, G. G., Kumegawa, M. & Cattoni, M. (1968) J. Cell Biol. 39, 340 - 350.

308. Rothblat, G. H. & Cristofalo, V. J., eds. Groth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture, Bd. 1 (1972), Bd. 2 (1972), Bd. 3 (1977), Academic Press, New York.

309. Rousseau, G. G. & Baxter, J. D. (1979) in: Glucocorticoid Hormone Action (Baxter, J. D. & Rousseau, G. G., eds.) S. 49 - 77, Springer Verlag, Heidelberg.

310. Roy, A. K. (1973) J. Endocrinol. 56, 295 - 301.

311. Rubin, K., Kjellén, L. & Ölbrink, B. (1977) Exp. Cell Res. 109, 413 - 422.

312. Rubin, K., Oldberg, Å., Höök, M. & Ölbrink, B. (1978) Exp. Cell Res. 117, 165 - 177.

313. Ruiz, J. P. G., Ingram, R. & Hanson, R. W. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 4189 - 4193.

314. Sandström, M. (1965) Exp. Cell Res. 37, 552 - 558.

315. Sato, G. H. (1975) in: Biochemical Actions of Hormones (Litwack, G., ed.) Bd. 3, S. 391 - 396, Academic Press, New York.

316. Sattler, C. A., Michalopoulos, G., Sattler, G. L. & Pitot, H. C. (1978) Cancer Res. 38, 1539 - 1549.

317. Savage, C. R. & Bonney, R. J. (1978) Exp. Cell Res. 114, 307 - 315.

318. Schaeffer, L. D., Chenoweth, M. & Dunn, A. (1969) Biochim. Biophys. Acta 192, 304 - 309.

319. Schapiro, S. (1968) Endocrinology 83, 475 - 478.

320. Schimassek, H. & Gerok, W. (1965) Biochem. Z. 343, 407 - 415.

321. Schimazu, T. & Fujimoto, T. (1971) Biochim. Biophys. Acta 252, 18 - 27.

322. Schimke, R. T. (1962) Biochim. Biophys. Acta 62, 599 - 601.

323. Schimke, R. T. (1962) J. Biol. Chem. 237, 459 - 468.

324. Schimke, R. T. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1921 - 1924.

325. Schimke, R. T. (1963) J. Biol. Chem. 238, 1012 - 1018.

326. Schimke, R. T. (1964) J. Biol. Chem. 239, 3808 - 3817.

327. Schimke, R. T. (1969) Curr. Top. Cell. Regul. 1, 77 - 124.

328. Schimke, R. T. & Doyle, D. (1970) Ann. Rev. Biochem. 39, 929 - 976.

329. Schirmer, G. (1978) Diplomarbeit, Universität Tübingen.

330. Schirmer, G., Gebhardt, R. & Mecke, D. (1979) Communications of Liver Cells, Falk Symposion 27, abstract 30.

331. Schmidt, G. & Thannhauser, S. J. (1945) J. Biol. Chem. 161, 83 - 89.

332. Schneider, W. C. (1945) J. Biol. Chem. 161, 293 - 303.

333. Schudt, C. (1979) Eur. J. Biochem. 98, 77 - 82.

334. Schworer, C. M. & Mortimore, G. E. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 3169 - 3173.

335. Seglen, P. O. (1973) Exp. Cell Res. 76, 25 - 30.

336. Seglen, P. O. (1973) Exp. Cell Res. 82, 391 - 398.

337. Seglen, P. O. (1976) Meth. Cell Biol. 13, 29 - 82.

338. Seglen, P. O. (1977) Biochim. Biophys. Acta 496, 182 - 191.

339. Seglen, P. O. & Fossø, J. (1978) Exp. Cell Res. 116, 199 - 206.

340. Shafrir, E. & Steinberg, D. (1960) J. Clin. Invest. 39, 310 - 319.

341. Shapiro, B. M. & Stadtman, E. R. (1970) Ann. Rev. Microbiol. 24, 501 - 524.

342. Sherman, B. M., Stagner, J. I. & Zamudio, R. (1977) Endocrinology 100, 1017 - 1022.

343. Shigesada, K. & Tatibana, M. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun 44, 1117 - 1124.

344. Shigesada, K. & Tatibana, M. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5588 - 5595.

345. Shigesada, K. & Tatibana, M. (1978) Eur. J. Biochem. 84, 285 - 291.

346. Shin, S. I., Freedman, V. H., Risser, R. & Pollack, R. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 4435 - 4439.

347. Shoemaker, W. C. & Elwyn, D. H. (1969) Ann. Rev. Physiol. 31, 227 - 268.

348. Sies, H., Summer, K. H. & Bücher, Th. (1975) FEBS Lett. 54, 274 - 278.

349. Siess, E. A. & Wieland, O. H. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 323 - 330.

350. Simon, M. L. & George, R. (1975) Neuroendocrinol. 17, 125 - 138.

351. Sippel, A. E., Feigelson, P. & Roy, A. K. (1975) Biochemistry 14, 825 - 829.

352. Sirica, A. E., Richards, W., Tsukada, Y., Sattler, C. A. & Pitot, H. C. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 283 - 287.

353. Skaaring, P. & Bierring, F. (1976) Cell Tissue Res. 171, 141 - 155.

354. Slavkin, H. C. & Greulich, R. C., eds. (1975) Extracellular Matrix Influences on Gene Expression, Academic Press, New York.

355. Snodgrass, P. J. (1972) Arch. Fr. Mal. App. Dig. 61, 405c.

356. Snodgrass, P. J. & Lin. R. C. (1976) Fed. Proc. 35, 1428.

357. Snodgrass, P. J., Lin, R. C., Müller, W. A. & Aoki, T. T. (1978) J. Biol. Chem. 253, 2748 - 2753.

358. Sokoloff, L. (1972) in: Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology (Rall, J. E. & Kopin, I. J., eds.) Bd. I, S. 148, North-Holland, Amsterdam.

359. Stadtman, E. R. (1973) in: The Enzymes of Glutamine Metabolism (Prusiner, S. & Stadtman, E. R., eds.) S. 1 - 6, Academic Press, New York.

360. Stadtman, E. R. & Ginsburg, A. (1974) in: The Enzymes (Boyer, P. D., ed.) Bd. 10, S. 755 - 807, Academic Press, New York.

361. Staib, W. & Scholz, R., eds. (1968) Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber, Springer Verlag, Heidelberg.

362. Stalmans, W. (1976) Curr. Top. Cell. Regul. 11, 51 - 97.

363. Stamadiadou, M. N. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 485 - 490.

364. Tanaka, K., Sato, M., Tomita, Y. & Ichihara, A. (1978) J. Biochem. 84, 937 - 946.

365. Tate, S. S., Leu, F. Y. & Meister, A. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5312 - 5321.

366. Tatibana, M. & Shigesada, K. (1976) in: The Urea Cycle (Grisolia, S., Báguena, R. & Mayor, F., eds.) S. 301 - 313, John Wiley, New York.

367. Tarlow, D. M., Watkins, P. A., Reed, R. E., Miller, R. S., Zwergel, E. E. & Lave, M. D. (1977) J. Cell. Biol. 73, 332 - 353.

368. Tell, G. P., Haour, F. & Saez, J. M. (1978) Metabolism 27, 1566 - 1592.

369. Tews, J. K., Woodcock, N. A. & Harper, A. E. (1970) J. Biol. Chem. 245, 3026 - 3032.

370. Thompson, E. B. & Lippman, M. E. (1974) Metabolism 23, 159 - 202.

371. Thompson, E. B. (1979) in: Glucocorticoid Hormone Action (Baxter, J. D. & Rousseau, G. G., eds.) S. 203 - 227, Springer Verlag, Heidelberg.

372. Tiemeier, D. C. & Milman, G. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5722 - 5727.

373. Tolleshaug, H., Berg, T. Nilsson, M. & Norum, K. R. (1977) Biochim. Biophys. Acta 499, 73 - 84.

374. Tomasi, V., Poli, A., Ferretti, E. & Barnabei, O. (1974) Adv. Enz. Regul. 13, 189 - 200.

375. Triebwasser, K. C. & Freedland, R. A. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 1159 - 1165.

376. Trinkaus, J. P. (1969) Cells into Organs, Prentice-Hall/ Englewood, New York.

377. Tsanev, R. & Sendov, B. L. (1971) J. Theoret. Biol. 30, 337 - 393.

378. Tsanev, R. (1975) in: Cell Cycle and Cell Differentiation. (Reinert, J. & Holtzer, H., eds.) Bd. 7, S. 197 - 248.

379. Uriel, J. (1976) Cancer Res. 36, 4269 - 4275.

380. Van der Meer, R. & Tager, J. M. (1976) FEBS Lett. 67, 36 - 40.

381. Van Rijn, H., Bevers, M. M., Van Wijk, R. & Wicks, W. D. (1974) J. Cell. Biol. 60, 181 - 191.

382. Varyhan, R. B. & Trinkaus, J. P. (1966) J. Cell. Sci. 1, 407 - 413.

383. Viceps, D. & Cristofalo, V. J. (1975) J. Cell. Physiol. 86, 9 - 14.

384. Voigt, J. D., Wieland, T. & Sekeris, C. E. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 191, 101 - 109.

385. Walker, P. R., Bonney, R. J., Becker, J. E. & Potter, V. R. (1972) In Vitro 8, 107 - 114.

386. Walker, P. R. (1977) in: Essays in Biochemistry (Campbell, P. N. & Aldridge, W. N., eds.) Bd. 13, S. 39 - 69.

387. Walter, P., Nyfeler, F., Fasel, P., von Glutz, G., Moser, U. K. & Sagarra, M. R. (1976) in: Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules (Tager, J. M., Söling, H. D. & Williamson, J. R., eds.) S. 167 - 174, North-Holland, Amsterdam.

388. Wanson, J. C., Drochmans, P., Mosselmans, R. & Ronveaux, M. F. (1977) J. Cell. Biol. 74, 858 - 877.

389. Wanson, J. C., Drochmans, P., Mosselmans, R. & Knook, D. L. (1977) in: Kupffer Cells and other Sinusoidal Cells (Wisse, E. & Knook, D. L., eds.) S. 141 - 150, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

390. Watanabe, H. (1966) Exp. Cell Res. 42, 685 - 699.

391. Waymouth, C. (1959) J. Natl. Cancer Inst. 22, 1003 - 1015.

392. Weigel, P. H., Schnell, E., Lee, Y. C. & Roseman, S. (1978) J. Biol. Chem. 253, 330 - 333.

393. Wheatley, D. N. (1972) Exp. Cell Res. 74, 455 - 465.

394. Wicks, W. D., Barnett, C. A. & Mc Kibben, J. B. (1974) Fed. Proc. 33, 1105 - 1111.

395. Wicks, W. D., Wagner, K., Roper, M. D., Leichtling, B. H. & Wimalasena, J. (1975) in: Gene Expression and Carcinogenesis in Cultured Liver (Gerschenson, L. E. & Thompson, E. B., eds.) S. 205 - 219, Academic Press, New York.

396. Williams, G. M., Stromberg, K. & Kroes, R. (1973) Lab. Invest. 29, 293 - 303.

397. Williams, G. M. (1977) Cancer Res. 37, 1845 - 1851.

398. Willmer, E. N., ed. (1965) Cells and Tissues in Culture, Bd. 1 - 3, Academic Press, New York.

399. Windmüller, H. G. & Spaeth, A. E. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5070 - 5079.

400. Wong, B. S. & Dunn, A. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 876 - 884.

401. Woodside, W. F. & Heimberg, M. (1978) Metabolism 27, 1763 - 1776.

402. Wu, C. (1964) Arch. Biochem. Biophys. 106, 394 - 401.

403. - Ibid. S. 402 - 409.

404. Wurtman, R. J. & Axelrod, J. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 57, 1594 - 1598.

405. Ymazaki, R. K. & Graetz, G. S. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 178, 19 - 25.

Lebenslauf

Am 16. Januar 1950 wurde ich als jüngstes von drei Kindern des Kaufmanns Karl Gebhardt und seiner Ehefrau Marta, geborene Vayhinger, in Crailsheim geboren.
Mit sieben Jahren trat ich in die Grundschule ein und wechselte nach 4 Jahren, im April 1961, auf das Albert-Schweitzer-Gymnasium in Crailsheim über. Hier legte ich im Juni 1969 die Reifeprüfung ab.
Im Oktober 1969 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität Stuttgart. Nach 2 Semestern wechselte ich an die Universität Tübingen und nahm hier im Oktober 1970 das Biochemiestudium auf. Ein Jahr später, im September 1971, begann ich ein Doppelstudium mit den Hauptfächern Biochemie und Mathematik.

Den ersten Teil der Diplom-Vorprüfung in Biochemie legte ich am 21. September 1971 ab, den zweiten Teil am 7. April 1972. Am 6. Oktober 1973, nach 4 Semestern Mathematikstudium, folgte auch im Fach Mathematik die Diplom-Vorprüfung. Den mündlichen Teil der Diplom-Hauptprüfung in Biochemie legte ich am 4. Februar 1975 ab. Anschließend arbeitete ich an meiner Diplomarbeit: "Isolation von Hepatozyten und enzymatische und metabolische Messungen an kultivierten Leberzellen", die ich im Februar 1976 abschloß.
Von April 1976 bis Dezember 1979 wurde die vorliegende Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Mecke am Physiologisch-chemischen Institut erarbeitet.
Thema: "HORMONALE WECHSELWIRKUNGEN BEI DER KONTROLLE HEPATISCHER ENZYMSPIEGEL - Primärkulturen von Hepatozyten als Modellsysteme für Untersuchungen zur Stoffwechselregulation"

Meine akademischen Lehrer für die biochemische Fachrichtung waren die folgenden Professoren und Dozenten:

Anatomie:	K. Mörike
Anorganische Chemie:	W. Rüdorff, H. Krebs, E. Fluck
Botanik:	H. Metzner, E. Bünning
Mikrobiologie:	H. Zähner
Organische Chemie:	E. Bayer,
Pharmakologie:	H. P. T. Ammon, H. Remmer
Physik:	H. Krüger
Physikalisch Chemie:	H. Mauser
Physiologie:	E. Betz
Physiologische Chemie:	D. Mecke, G. Weitzel
Theoretische Chemie:	F. F. Seelig
Zoologie:	K. Grell, F. P. Möhres

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (07472) 22145